

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 01 SEP. 1999

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Petersburg
75300 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI DATE DE REMISE DES PIÈCES 1 SEPT 1998 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 98 10914 DÉPARTEMENT DE DÉPÔT 31 INPI TOULOUSE DATE DE DÉPÔT 01 SEP. 1998		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Cabinet BARRE LAFORGUE & associés 95 rue des Amidonniers 31000 TOULOUSE	
2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> demande initiale <input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n° Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non de l'invention (200 caractères maximum) NOUVEAUX COMPOSÉS PHOSPHOÉPOXYDES, PROCÉDE DE FABRICATION ET APPLICATIONS.		n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone AN2C-BF7756K3 05 61 21 08 67 date	
3 DEMANDEUR (S) n° SIREN Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE Nationalité (s) Française Adresse (s) complète (s) 101, rue Tolbiac 75013 PARIS		code APE-NAF Forme juridique Etablissement public, scientifique et technologique, doté de la personnalité civile et de l'autonomie financière Pays FRANCE	
4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée			
5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission			
6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE pays d'origine numéro date de dépôt nature de la demande			
7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date			
8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire) Le Mandataire BARRE LAFORGUE & associés PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE EN FRANCE ET À L'ÉTRANGER 95 rue des amidonniers 31000 TOULOUSE C. LASSAILLE-N°CPI 92.1137		SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI	

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 10914

TITRE DE L'INVENTION :

NOUVEAUX COMPOSÉS PHOSPHOÉPOXYDES, PROCÉDE DE FABRICATION
ET APPLICATIONS.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

Cabinet BARRE LAFORGUE & associés

95 rue des Amidonniers

31000 TOULOUSE

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

BELMANT Christian

16 rue Marcel Pagnol

31700 BLAGNAC

FOURNIE Jean-Jacques

8 Jardins de la Soulane

31450 CORRONNAC

BONNEVILLE Marc

Route de la Massonnière

44120 VERTOU

PEYRAT Marie-Alix

4 Place des Libertés

44230 SAINT-SEBASTIEN SUR LOIRE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Le 1er septembre 1998

NOUVEAUX COMPOSES PHOSPHOEPOXYDES, PROCEDE DE FABRICATION ET APPLICATIONS.

L'invention concerne de nouveaux composés
5 phosphoépoxydes, leur procédé de fabrication et leurs applications pour la
stimulation des lymphocytes $T\gamma\delta$ porteurs de récepteurs TCR à régions
variables $V\gamma 9$ et $V\delta 2$.

Les lymphocytes $T\gamma\delta$ des primates présents dans le sang
périphérique (humains, singes) représentent, chez l'individu sain, habituellement
10 de 1 à 5% des lymphocytes du sang et jouent un rôle dans le système
immunitaire. Il a été démontré qu'ils reconnaissent leurs ligands antigéniques par
une interaction directe avec l'antigène, sans présentation par les molécules du
CMH d'une cellule présentatrice. Les lymphocytes $T\gamma\delta$ (parfois aussi désignés
lymphocytes $T\gamma 2\delta 2$) sont des lymphocytes $T\gamma\delta$ porteurs de récepteurs TCR à
15 régions variables $V\gamma 9$ et $V\delta 2$. Ils représentent la majorité des lymphocytes $T\gamma\delta$
dans le sang humain.

Lorsqu'ils sont activés, les lymphocytes $T\gamma\delta$ exercent une
puissante activité cytotoxique non restreinte par le CMH, particulièrement
efficace pour tuer divers types de cellules, notamment des cellules pathogènes. Il
20 peut s'agir de cellules infectées par des virus (" $\gamma\delta$ T cell activation or anergy
during infections : the role of nonpeptidic TCR ligands and HLA class I
molecules" Fabrizio POCCIA *et al*, Journal of Leukocyte Biology, 62, 1997, p.
1-5), ou par d'autres parasites intracellulaires tels que les mycobactéries ("The
antituberculous *Mycobacterium bovis* BCG Vaccine is an attenuated
25 Mycobacterial producer of phosphorylated nonpeptidic Antigens for human $\gamma\delta$ T
cells" Patricia CONSTANT *et al*, Infection and Immunity, vol. 63, n° 12, Dec.
1995, p. 4628-4633) ; ou les protozoaires ("*Plasmodium falciparum* stimuli for
human $\gamma\delta$ T Cells are related to phosphorylated Antigens of mycobacteria"
Charlotte BEHR *et al*, Infection and Immunity, Vol. 64, n° 8, 1996, p. 2892-
30 2896). Il peut aussi s'agir de cellules cancéreuses ("CD94/NKG2 inhibitory
receptor complex modulates both antiviral and antitumoral responses of
polyclonal phosphoantigen-reactive $V\gamma 9$ $V\delta 2$ T lymphocytes" Fabrizio POCCIA

et al, Journal of Immunology, 159, p. 6009-6015 ; "Stimulation of $\gamma\delta$ T cells by phosphoantigens" Jean-Jacques FOURNIE, Marc BONNEVILLE, Res. Immunol., 66th FORUM IN IMMUNOLOGY, 147, P. 338-347).

Il a été démontré que les lymphocytes Ty982 humains réagissent dans le cas d'une infection mycobactérienne à quatre molécules naturelles non peptidiques de structure phosphatée, désignées phosphoantigènes, qui présentent une activité de stimulation pour une concentration de l'ordre de 1 à 5 nM (nanomolaire) (WO-95/20673 et "Stimulation of human $\gamma\delta$ T cells by nonpeptidic Mycobacterial ligands" Patricia CONSTANT *et al*, Science, 264, p. 267-270).

Ces antigènes naturels ne sont pas complètement identifiés. Certains auteurs les ont présentés, à tort, comme des dérivés alcènes du pyrophosphate, notamment l'isopentényl pyrophosphate IPP (US-5 639 653 et "Natural and Synthetic nonpeptide antigens recognized by human $\gamma\delta$ T cells", Yoshimasa TANAKA *et al*, Nature, 375, 1995, p. 155-158). Néanmoins, il est maintenant démontré qu'aucun de ces prénylpyrophosphates n'est actif à une concentration de l'ordre du nanomolaire. Les meilleurs résultats obtenus n'arrivent pas à démontrer une activité à moins de 3 μ M pour l'IPP, et à 0,3 μ M pour le diméthyl allyl-UTP et le 3-Méthyl-2-hexène pyrophosphate. La concentration minimale d'activité de ces composés est donc, au mieux, de l'ordre de 100 fois plus importante que celle des phosphoantigènes naturels.

En ce qui concerne l'IPP, il est à noter en particulier que les dernières publications mentionnées ci-dessus commettent une erreur en déduisant la structure du radical isopentenyl à partir de la seule analyse du spectre de masse et de la mise en évidence d'une certaine bioactivité. En effet, outre le fait que le composé analysé dans les publications n'était pas purifié et qu'un spectre de masse ne peut pas identifier des espèces non chargées, on peut démontrer qu'il existe en fait plusieurs milliers de structures chimiques différentes pouvant avoir cette même masse moléculaire et être un substituant du pyrophosphate dans ces molécules.

Le fait que la concentration minimale d'activité de l'IPP soit beaucoup plus élevée (de l'ordre de 1000 fois) et que l'intensité des réponses

lymphocytaires T γ 9 δ 2 obtenues soit beaucoup plus faible que celles des phosphoantigènes naturels démontre que l'IPP n'est pas l'un de ces phosphoantigènes naturels ("A novel nucleotide-containing antigen for human blood $\gamma\delta$ T lymphocytes", Y. Poquet *et al*, Eur. J. Immunol. 1996, 26, p. 2344-2349). Cela est d'ailleurs confirmé par de nombreuses autres constatations : on ne trouve pas d'IPP en concentration suffisante dans les extraits mycobactériens stimulant les lymphocytes T γ 9 δ 2 ; l'IPP n'a pas les mêmes caractéristiques chromatographiques (HPAEC) selon : "High pH anion exchange chromatographic analysis of phosphorylated compounds : application to isolation and characterization of non peptide mycobacterial antigens", Y. Poquet *et al*, Anal. Biochem, 243 n° 1, 1996, p. 119-126, que les phosphoantigènes naturels ; l'IPP et les autres isoprénoïdes naturels sont produits par toutes les cellules vivantes, qui ne stimulent pourtant pas les lymphocytes T γ 9 δ 2.

Par ailleurs, on sait que les substances dont la bioactivité est de l'ordre de ou supérieure à 1 μ M ne sont que rarement compatibles avec les contraintes de rentabilité d'une exploitation à l'échelle industrielle. Ainsi, les phosphoantigènes synthétiques proposés jusqu'à maintenant ne sont pas exploitables à l'échelle industrielle dans des conditions économiques acceptables.

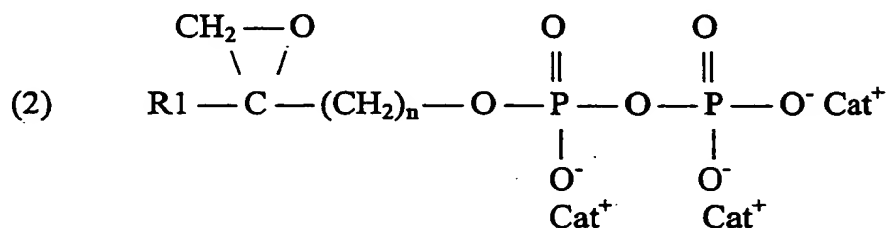
Les phosphoantigènes naturels, quant à eux, ne peuvent être produits qu'en très faibles quantités (WO 95/20673), et leur structure chimique exacte restant encore indéterminée, il n'est pas possible de les produire par synthèse. Il n'est donc pas non plus possible d'envisager une exploitation à l'échelle industrielle dans des conditions économiques, malgré leur grand intérêt thérapeutique démontré.

L'invention vise donc à proposer des nouveaux composés chimiques qui soient activateurs des lymphocytes T γ 9 δ 2 pour une concentration minimale d'activation inférieure à 100nM, notamment de l'ordre de 10nM.

L'invention vise aussi à proposer des composés pouvant être couplés à un grand nombre de groupements organiques, notamment à des groupements peptidiques naturels ou synthétiques, de façon à permettre l'obtention de composés multifonctionnels.

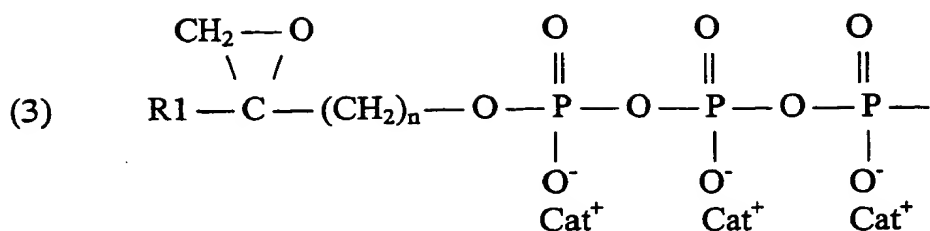
pentyl-diphosphate ; 5,6 époxy-5-méthyl-1-hexyl-diphosphate ; 5,6 époxy-5-éthyl-1-hexyl-diphosphate ; 6,7 époxy-6-méthyl-1-heptyl-diphosphate ; 6,7 époxy-6-éthyl-1-heptyl-diphosphate ; 7,8 époxy-7-méthyl-1-octyl-diphosphate ; 7,8 époxy-7-éthyl-1-octyl-diphosphate ; 8,9 époxy-8-méthyl-1-nonyl-diphosphate ; 8,9 époxy-8-éthyl-1-nonyl-diphosphate ; 9,10 époxy-9-méthyl-1-décyl-diphosphate ; 9,10 époxy-9-éthyl-1-décyl-diphosphate ; 10,11 époxy-10-méthyl-1-undécyl-diphosphate ; 10,11 époxy-10-éthyl-1-undécyl-diphosphate ; 11,12 époxy-11-méthyl-1-dodécyl-diphosphate ; 11,12 époxy-11-éthyl-1-dodécyl-diphosphate ; 12,13 époxy-12-méthyl-1-tridécyl-diphosphate ; 12,13 époxy-12-éthyl-1-tridécyl-diphosphate ; 13,14 époxy-13-méthyl-1-tétradécyl-diphosphate ; 13,14 époxy-13-éthyl-1-tétradécyl-diphosphate ; 14,15 époxy-14-méthyl-1-pentadécyl-diphosphate ; 14,15 époxy-14-éthyl-1-pentadécyl-diphosphate ; 15,16 époxy-15-méthyl-1-hexadécyl-diphosphate ; 15,16 époxy-15-méthyl-1-hexadécyl-diphosphate ; 16,17 époxy-16-méthyl-1-heptadécyl-diphosphate ; 16,17 époxy-16-éthyl-1-heptadécyl-diphosphate ; 17,18 époxy-17-méthyl-1-octadécyl-diphosphate ; 17,18 époxy-17-éthyl-1-octadécyl-diphosphate ; 18,19 époxy-18-méthyl-1-nonadécyl-diphosphate ; 18,19 époxy-18-éthyl-1-nonadécyl-diphosphate ; 19,20 époxy-19-méthyl-1-eicosyl-diphosphate ; 19,20 époxy-19-éthyl-1-eicosyl-diphosphate ; 20,21 époxy-20-méthyl-1-heneicosyl-diphosphate ; 20,21 époxy-20-éthyl-1-heneicosyl-diphosphate ; 21,22 époxy-21-méthyl-1-docosyl-diphosphate ; 21,22 époxy-21-méthyl-1-docosyl-diphosphate.

L'invention concerne en particulier les composés phosphoépoxydes répondant à la formule suivante :



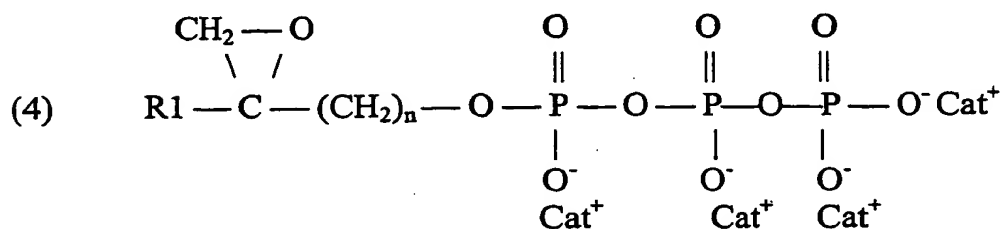
pour leur utilisation à titre de substances thérapeutiquement actives;

L'invention concerne aussi des nouveaux composés
comprenant au moins un groupement phosphoépoxyde de formule :



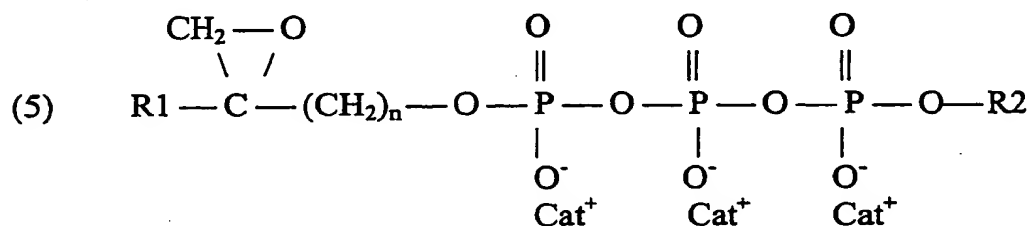
5

10 Parmi les nouveaux composés selon l'invention répondant à la formule (3), on peut citer les composés phosphoépoxydes de formule :



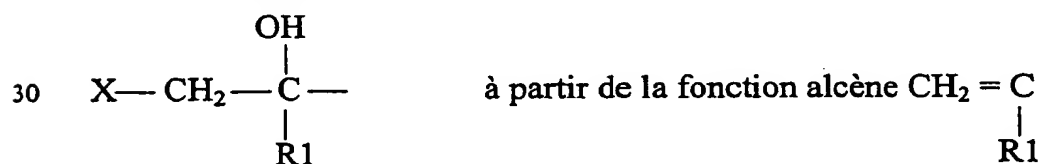
15

et les composés phosphoépoxydes de formule :



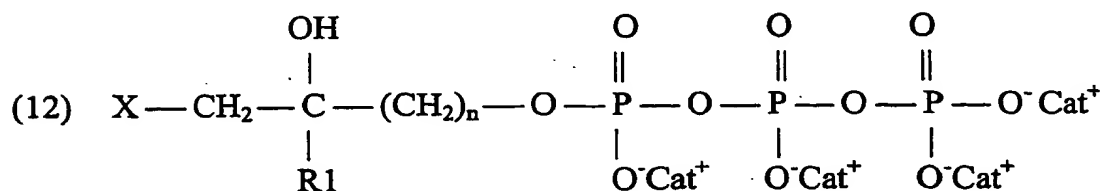
25

où R2 est un substituant organique ou minéral choisi dans le groupe formé :
- des substituants qui n'empêchent pas la formation de la fonction halohydrine



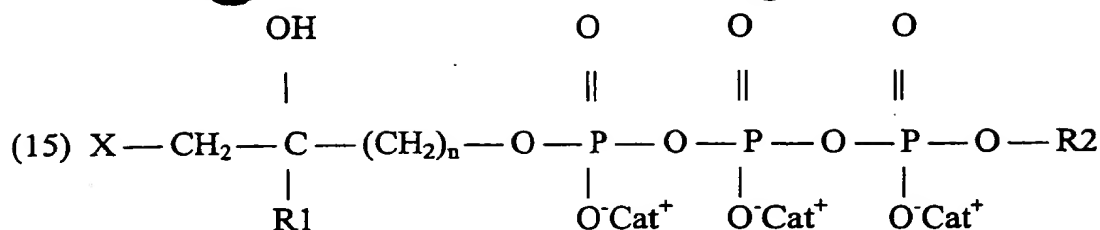
et de l'halogène X₂ en présence d'eau ;

35 - des substituants pour lesquels il existe un composé R2-O-Y non réactif sur la fonction halohydrine du composé de formule :



40

et choisi pour que R2-O-Y puisse réagir sur le phosphate terminal de ce composé (12) pour obtenir le composé de formule (15) :



- et des substituants pour lesquels il existe un composé R₂-O-PPP, où PPP symbolise le groupement triphosphate.

Avantageusement, lesdits composés selon l'invention sont caractérisés en ce que n = 2 et R₁ est CH₃.

Les composés selon l'invention comprennent avantageusement en outre au moins un groupement choisi dans le groupe formé des dérivés des nucléosides, des oligonucléotides, des acides nucléiques (ARN, ADN), des acides aminés, des peptides, des protéines, des monosaccharides, des oligosaccharides, des polysaccharides, des acides gras, des lipides simples, des lipides complexes, de l'acide folique, de l'acide tétrahydrofolique, des acides phosphoriques, de l'inositol, des vitamines, des co-enzymes, des flavonoïdes, des aldéhydes, des halohydrines, et des époxydes.

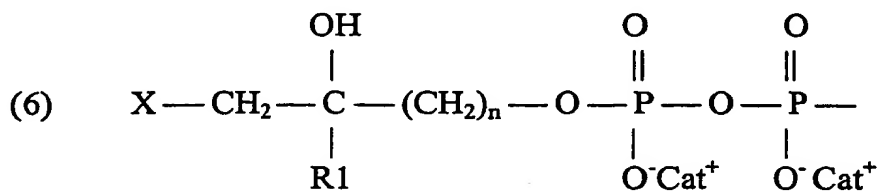
En particulier, l'invention s'étend aux composés phosphoépoxydes selon la formule (5) ci-dessus dans lesquels R₂ est en outre choisi dans le groupe formé des dérivés des nucléosides, des oligonucléotides, des acides nucléiques (ARN, ADN), des acides aminés, des peptides, des protéines, des monosaccharides, des oligosaccharides, des polysaccharides, des acides gras, des lipides simples, des lipides complexes, de l'acide folique, de l'acide tétrahydrofolique, des acides phosphoriques, de l'inositol, des vitamines, des co-enzymes, des flavonoïdes, des aldéhydes, des halohydrines, des phosphoépoxydes selon la formule (1), et des époxydes.

L'invention s'étend aussi aux composés dont la structure incorpore plusieurs groupements conformes à la formule (1), identiques ou différents, par exemple des monomères, polymères, oligomères ou dendrimères, ou plus généralement des molécules à plusieurs branches phosphatées conformes à la formule (1).

Il est à noter que les composés selon l'invention sont des esters (monoesters ou diesters) d'acide phosphorique (ce terme englobant les acides où le phosphore est au degré d'oxydation V, à savoir l'acide orthophosphorique, l'acide pyrophosphorique, l'acide métaphosphorique, l'acide triphosphorique, les autres acides polyphosphoriques).

L'invention s'étend à un procédé de fabrication des composés selon l'invention. Ce procédé est caractérisé en ce que :

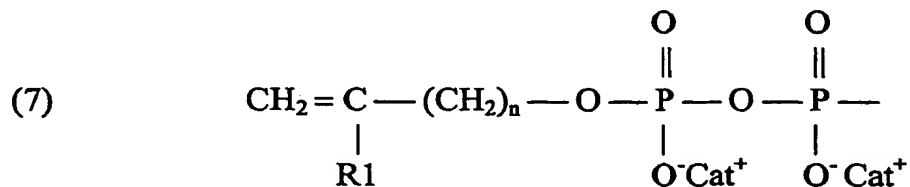
- on prépare tout d'abord un composé intermédiaire comprenant au moins un groupement phosphohalohydrine de formule :



où X est un halogène choisi parmi l'iode, le brome et le chlore.

- on fait réagir le composé intermédiaire avec un milieu générateur d'hydroxydes pour transformer les fonctions halohydrines du composé intermédiaire en fonctions époxydes.

Avantageusement et selon l'invention pour préparer ledit composé intermédiaire, on fait réagir l'halogène X_2 en présence d'eau avec un composé de départ comprenant au moins un groupement alcène phosphaté de formule :

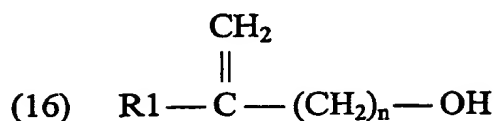


Avantageusement et selon l'invention, on fait réagir un sel formé dudit composé de départ en milieu aqueux ou hydroalcoolique, à pH neutre, à une température inférieure à 30°C , par mélange avec une solution aqueuse de l'halogène X_2 . Avantageusement et selon l'invention, on effectue la

réaction sous pression atmosphérique à une température comprise entre 0°C et 25°C.

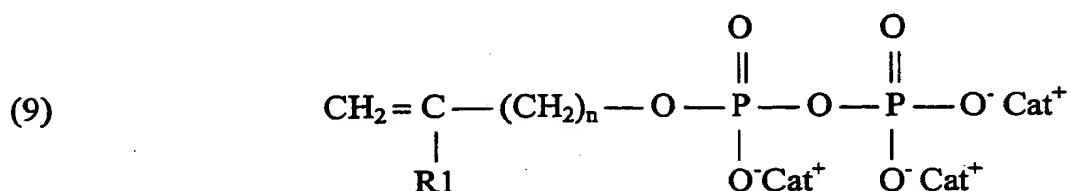
Les composés de départ peuvent être eux-mêmes obtenus à partir de l'alcool :

5



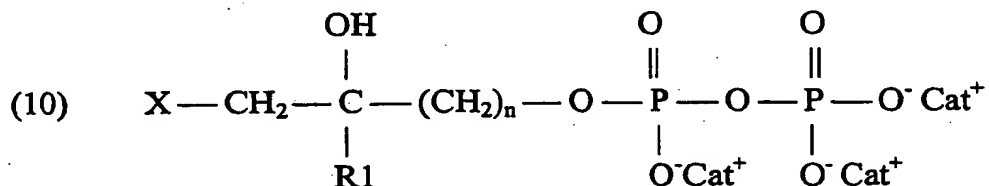
Avantageusement et selon l'invention, le composé de départ
est un sel de formule :

15



On obtient alors le composé intermédiaire
pyrophosphohalohydrine selon la formule :

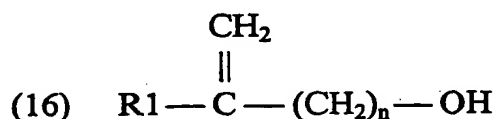
20



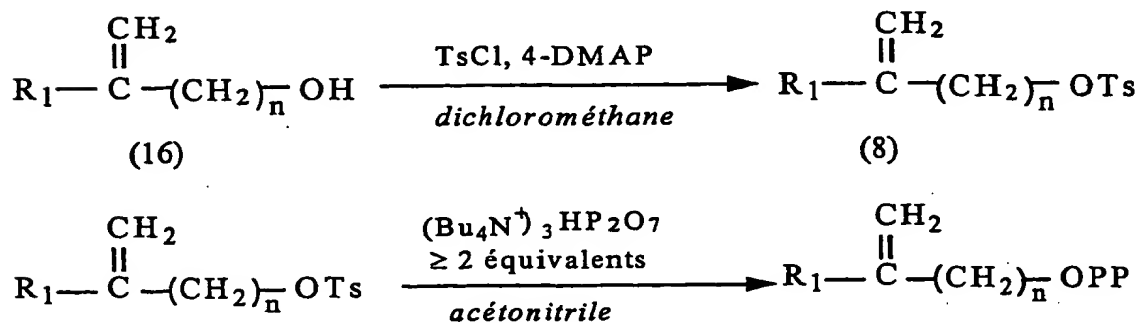
25

Un exemple de schéma réactionnel complet d'obtention du
composé intermédiaire (10) à partir de l'alcool (16) est le suivant :

30

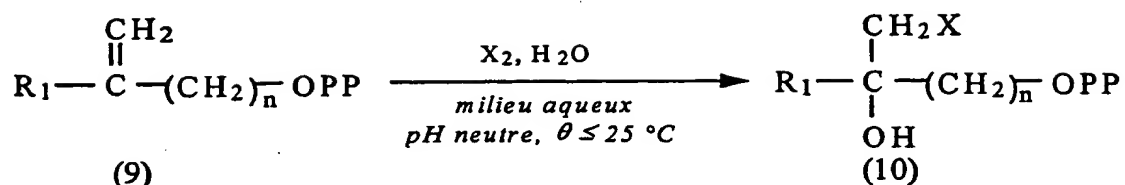


35



(8)

(9)



où TsCl est le chlorure de tosyle,

4-DMAP est le 4-diméthylaminopyridine,

Bu₄N⁺ est le tétrabutylammonium,

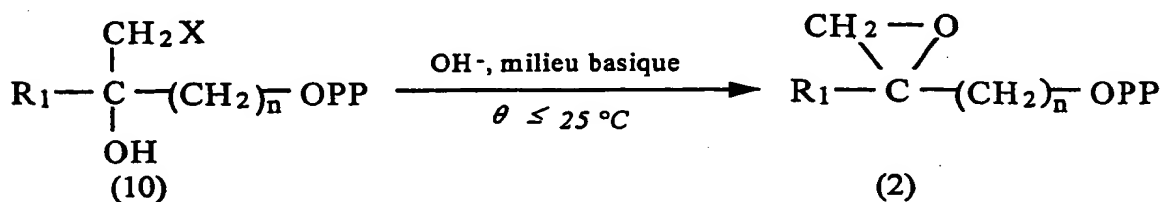
(Bu₄N⁺)₃HP₂O₇ est le tris (tétra n-butylammonium)

hydrogènoxyphosphate,

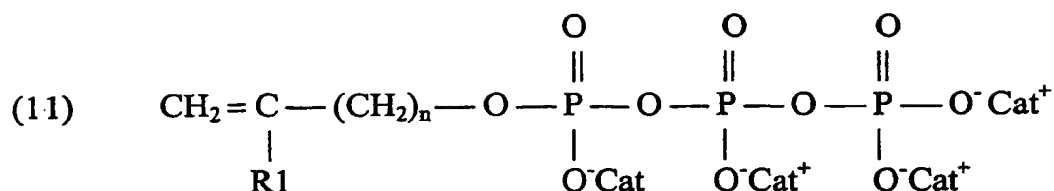
PP symbolise le groupement pyrophosphate.

Les réactions permettant d'obtenir le composé (9) à partir de l'alcool (16) peuvent être effectuées comme décrit par : DAVISSON V.J. *et al.* "Phosphorylation of Isoprenoid Alcohols" J. Org. Chem 1986, 51,4768-4779, et DAVISSON V.J. *et al.* "Synthesis of Allylic and Homoallylic Isoprenoid Pyrophosphates" Methods in Enzymology, 1984, 110, 130-144.

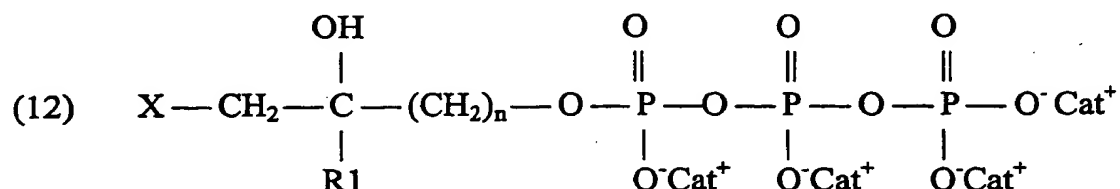
A partir du composé intermédiaire (10), on obtient le composé selon l'invention de formule (2) selon le schéma suivant :



Avantageusement et selon l'invention, le composé de départ est un sel de formule :

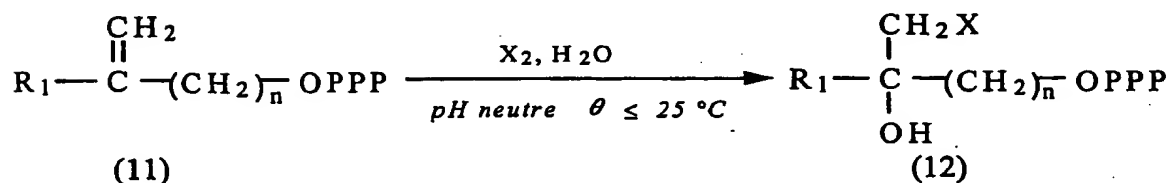
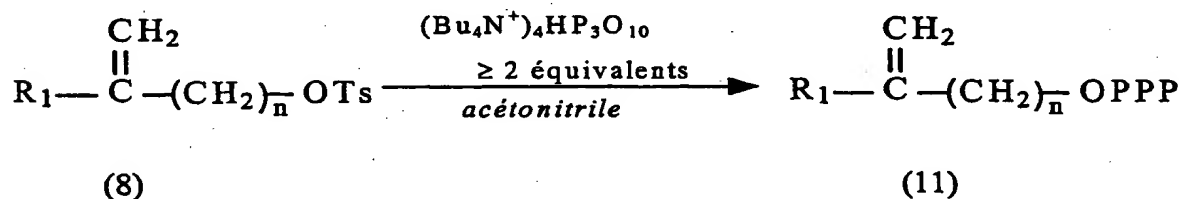


On obtient alors le composé intermédiaire triphosphohalohydrine selon la formule :



On obtient ensuite le composé triphosphoépoxyde (4) selon l'invention.

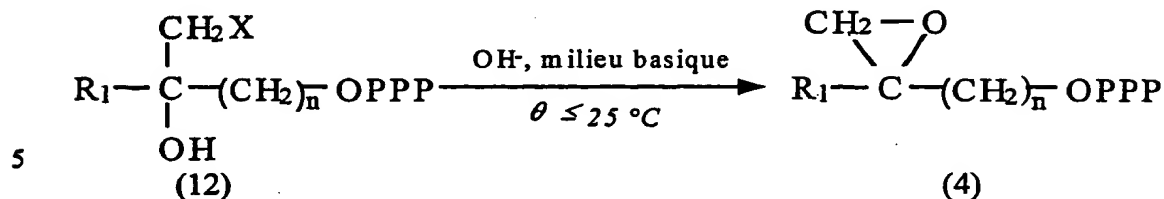
Un exemple de schéma réactionnel complet d'obtention du composé (4) selon l'invention à partir de l'alcool (16) est le suivant :



où PPP est le groupement triphosphate,

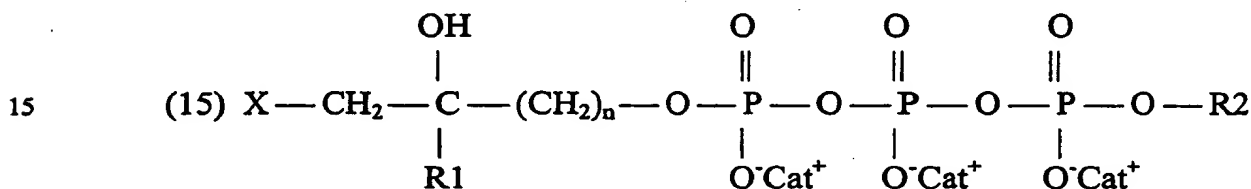
$(\text{Bu}_4\text{N}^+)_4\text{HP}_3\text{O}_{10}$ est le tétrakis (tétra n-butylammonium) hydrogènotriphosphate. Le composé (8) est obtenu à partir de l'alcool (16) comme indiqué précédemment.

A partir du composé intermédiaire (12), on obtient le composé triphosphoépoxyde selon l'invention de formule (4) selon le schéma suivant :

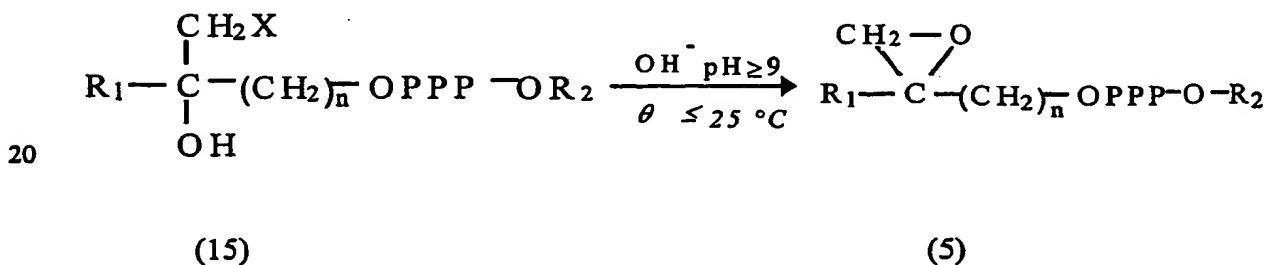


Pour préparer un composé phosphoépoxyde selon l'invention conforme à la formule (5), plusieurs variantes sont possibles.

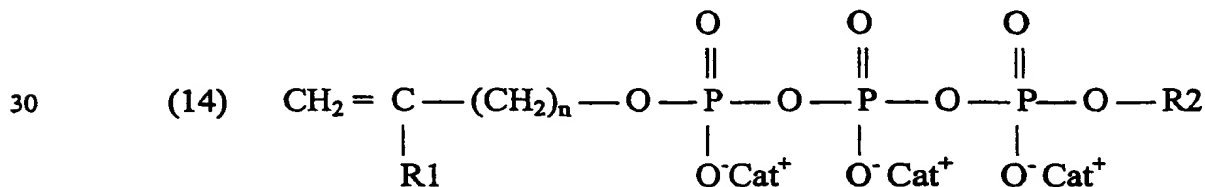
Dans une première variante, on prépare tout d'abord un composé intermédiaire phosphohalohydrine de formule :



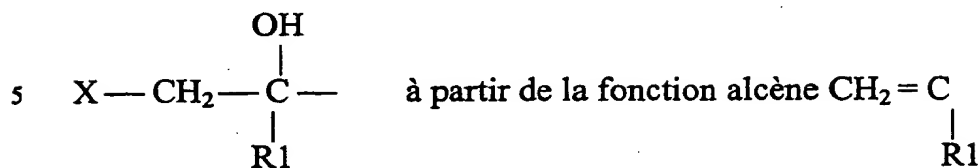
Ainsi, on obtient le composé (5) selon la réaction suivante :



Pour ce faire, on peut effectuer le procédé tel que mentionné ci-dessus (réaction de X_2 en présence d'eau sur une fonction alcène phosphatée) en prenant, à titre de composé de départ, un sel de formule :



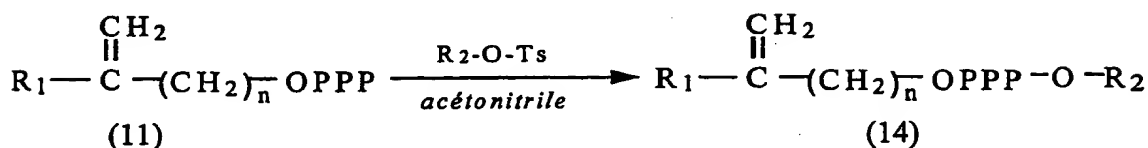
où R2 est un substituant organique ou minéral adapté pour ne pas empêcher la formation de la fonction halohydrine



et de l'halogène X₂ en présence d'eau.

10 Le composé de départ (14) peut lui-même être préparé selon l'un des schémas réactionnels suivants :

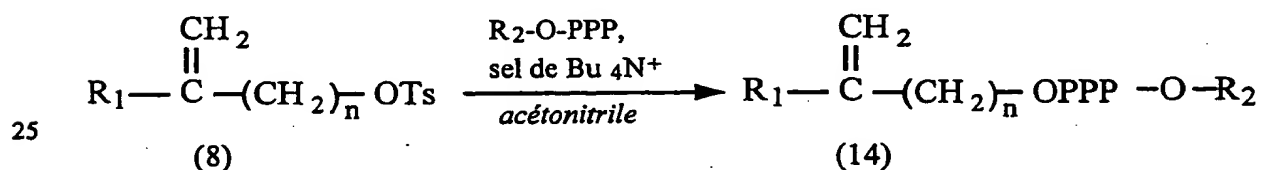
- Schéma réactionnel 1 :



où Ts est le tosyle.

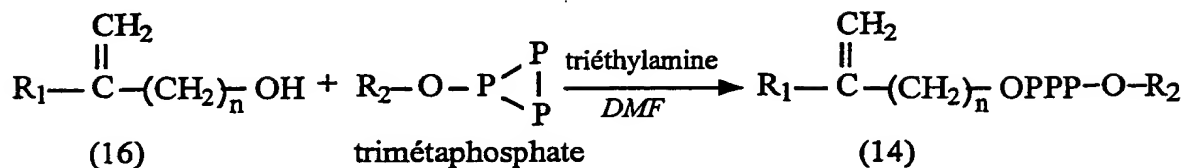
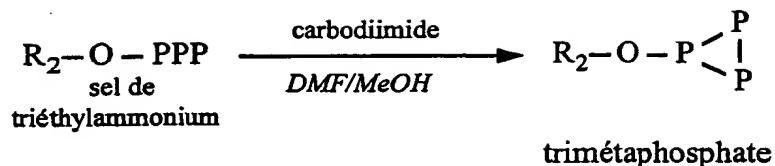
Le composé (11) peut être obtenu comme indiqué précédemment à partir de l'alcool (16) et du composé intermédiaire (8). La réaction permettant d'obtenir le composé (14) à partir du composé (11) peut être effectuée dans des conditions semblables à celles décrites dans les publications DAVISSON V.J. *et al.* Ce schéma peut être utilisé lorsque R₂-O-Ts est commercialement disponible.

- Schéma réactionnel 2 :



30 Le composé intermédiaire (8) peut être obtenu comme indiqué précédemment à partir de l'alcool (16). La réaction permettant d'obtenir le composé (14) à partir du composé (8) peut être effectuée dans des conditions semblables à celles décrites dans les publications DAVISSON V.J. *et al.* Ce schéma peut être utilisé lorsque R₂-O-PPP est commercialement disponible.

- Schéma réactionnel 3 :



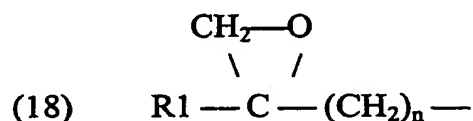
où DMF est le diméthylformamide,

MeOH est le méthanol.

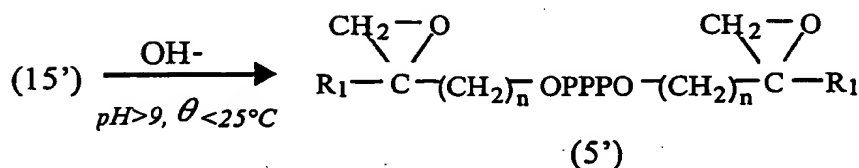
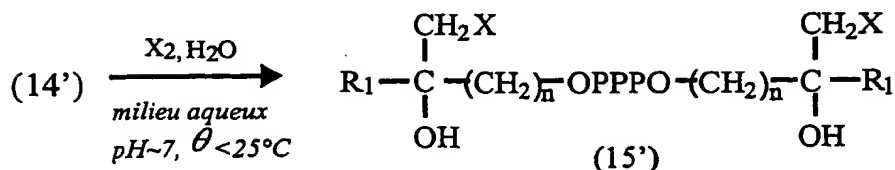
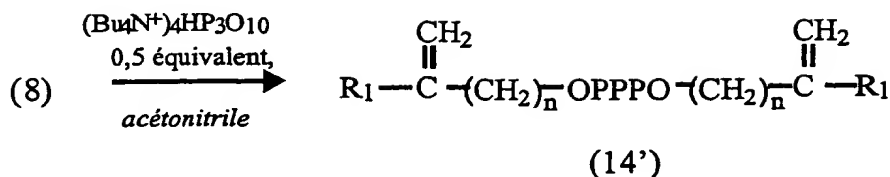
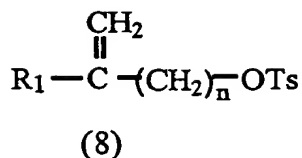
Ce schéma réactionnel peut être mis en œuvre dans des conditions similaires à celles décrites dans D.G. KNORRE *et al* "General method for the synthesis of ATP gamma derivatives" Febs LETTERS, 1976, 70, 105-108.

Ce schéma réactionnel n'est pas utilisable lorsque R2 comporte une fonction réactive au carbodiimide (carboxylate, triphosphate...). Elle est par contre avantageuse lorsque R2-O-PPP est commercialement disponible.

Dans le cas particulier où R2- est lui-même un groupement époxyde de formule :



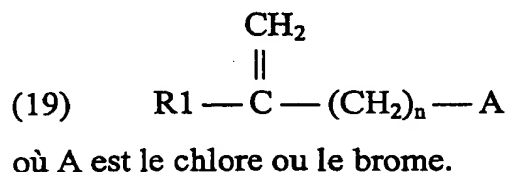
on peut utiliser le schéma réactionnel suivant :



Le composé (5') est un cas particulier de composé (5) selon l'invention.

5 Il est à noter que dans toutes ces réactions, l'acétonitrile peut être remplacé par tout autre solvant dipolaire aprotique (diméthylformamide DMF, diméthylsulfoxyde DMSO...).

Il est à noter qu'à la place du composé intermédiaire (8) pour la préparation des composés (2), (4) et (5'), et dans le cas où $n \neq 2$ on peut
10 aussi utiliser le composé chlorure ou bromure correspondant de formule :

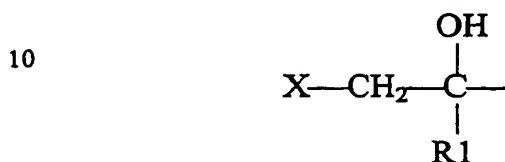


15 Les alcools (16) sont commercialement disponibles ou peuvent être aisément obtenus par une réaction de Grignard bien connue entre un organomagnésien d'alcényle et le formaldéhyde ou l'oxyde d'éthylène.

Dans une deuxième variante, pour préparer le composé intermédiaire (15), dans certains cas, on pourrait faire réagir le composé

triphosphohalohydrine intermédiaire de formule (12), à partir d'un sel soluble en milieu organique tel qu'un sel de Bu_4N^+ , dans une étape ultérieure avec un composé $\text{R}_2\text{-O-Y}$, où $-\text{O-Y}$ est un groupement partant et R_2 est un substituant organique ou minéral choisis pour que $\text{R}_2\text{-O-Y}$ puisse former, par réaction sur le composé (12), le composé intermédiaire de formule (15).

Pour pouvoir former ainsi le composé intermédiaire selon la formule (15), le composé $\text{R}_2\text{-O-Y}$ ne doit notamment pas être réactif sur la fonction halohydrine :



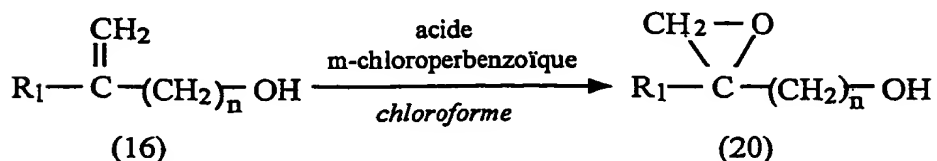
En outre, $\text{R}_2\text{-O-Y}$ doit réagir sur le phosphate terminal du composé (12) pour former le composé (15).

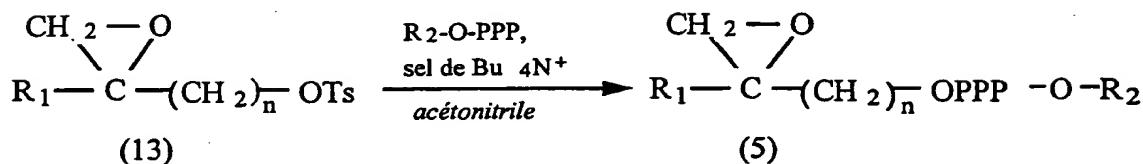
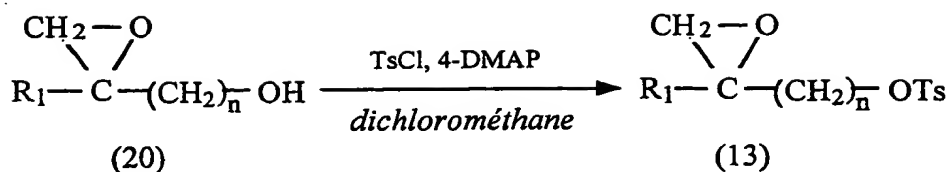
La réaction du composé de formule (12) sur $\text{R}_2\text{-O-Y}$ est une substitution nucléophile. Cette réaction est en particulier possible et avantageuse pour R_2 choisi dans le groupe formé des alkyles et des alcènes. Y est choisi de telle sorte que $\text{R}_2\text{-O-Y}$ puisse donner le composé (15) par substitution nucléophile. Y est par exemple choisi parmi le tosylo, le brosylo et le triflylo.

Cette deuxième variante permet ensuite de préparer le composé phosphoépoxyde selon l'invention de formule (5) en faisant réagir le composé intermédiaire (15) en milieu aqueux basique pour transformer les fonctions halohydrine du composé intermédiaire (15) en fonctions époxydes comme indiqué ci-dessus.

Dans une troisième variante, on peut préparer le composé phosphoépoxyde selon l'invention, sans passer par le composé intermédiaire (15), à partir de l'alcool (16) selon le schéma réactionnel suivant :

30



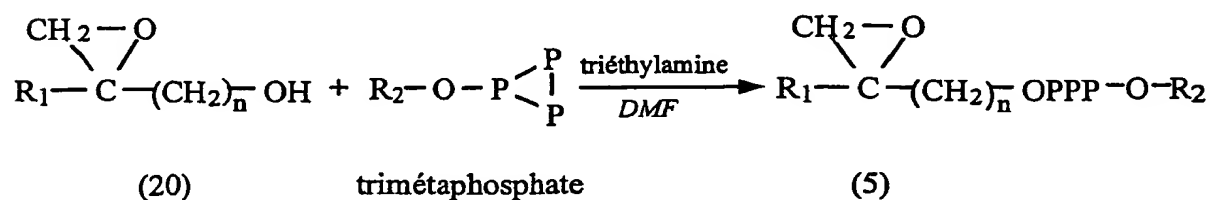
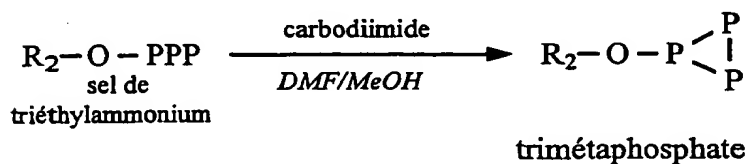


Cette troisième variante est notamment avantageuse lorsque R₂-O-PPP est commercialement disponible ou lorsque la préparation du composé intermédiaire phosphohalohydrine (15) n'est pas possible.

Cette réaction consistant à transformer la fonction alcène en fonction époxyde peut être effectuée comme indiqué par G.M. RUBOTTOM *et al.*, Org. Synth. Coll. Vol. 7, p 282 (1990), Wiley.

Ce schéma réactionnel peut être aussi utilisé pour obtenir directement les composés monoesters (2) et (4) selon l'invention. Néanmoins, avec ces composés monoesters, la fabrication à partir des composés intermédiaires phosphohalohydrines est en général plus rapide, plus quantitative, et plus facile à mettre en œuvre.

Dans une quatrième variante, on utilise le schéma réactionnel suivant :



Cette réaction peut être effectuée dans les conditions décrites par D.G. KNORRE *et al* "General method for the synthesis of ATP gamma derivatives" Febs letters, 1976, 70, 105-108.

Ainsi, un composé selon l'invention peut être bifonctionnel ou multifonctionnel. La(les) fonction(s) phosphoépoxyde(s) procure(nt) la propriété antigénique vis-à-vis des lymphocytes T γ 9 δ 2, et R2 ou les autres groupements fonctionnels du composé peuvent présenter d'autres propriétés, notamment thérapeutiques.

Dans le cas d'un composé selon l'invention ayant plusieurs groupements phosphoépoxydes conformes à la formule (1), il suffit soit de partir d'un composé de départ ayant le nombre correspondant de groupements alcènes phosphatés de formule (7) et la structure chimique correspondante (première variante), soit d'utiliser le composé de formule (12) et de le faire réagir avec un composé intermédiaire R2-O-Y ayant le nombre correspondant de fonctions -O-Y (deuxième variante), soit d'utiliser un composé R2-O-PPP incorporant déjà d'autres fonctions époxydes (troisième et quatrième variantes).

L'invention s'étend également aux utilisations des composés selon l'invention à titre d'activateur des lymphocytes T γ 9 δ 2 des primates, notamment à titre d'activateur de la prolifération et/ou de l'activité cytotoxique et/ou de la production de substance(s) médiatrice(s) des lymphocytes T γ 9 δ 2 des primates à récepteurs TCR comprenant les régions variables V γ 9 et V δ 2.

L'invention s'étend aussi aux applications des composés selon l'invention pour le traitement de cellules sensibles aux lymphocytes T γ 9 δ 2 des primates, dans un milieu naturel ou artificiel pouvant contenir des lymphocytes T γ 9 δ 2, dans lequel lesdites cellules peuvent être mises en contact avec ces lymphocytes T γ 9 δ 2, et qui est compatible avec les composés selon l'invention (c'est-à-dire n'est pas susceptible d'en provoquer la dégradation au moins dans certaines conditions du traitement).

Par "cellule sensible aux lymphocytes T γ 9 δ 2", on entend toute cellule sujette à l'activité effectrice induite des lymphocytes T γ 9 δ 2 (mort cellulaire ; réception de cytokine relarguée par les lymphocytes T γ 9 δ 2 (TNF- α ,

INF- γ ...) ; éventuellement prolifération cellulaire induite par les lymphocytes T γ 9 δ 2).

L'invention s'étend donc à un procédé d'activation des lymphocytes T γ 9 δ 2 -notamment à un procédé d'activation de la prolifération des lymphocytes T γ 9 δ 2 et/ou de l'activité cytotoxique des lymphocytes T γ 9 δ 2 et/ou de la production de substance(s) médiatrice(s) par les lymphocytes T γ 9 δ 2- dans lequel on met ces lymphocytes T γ 9 δ 2 au contact d'au moins un composé selon l'invention dans un milieu contenant des lymphocytes T γ 9 δ 2 compatible avec la croissance lymphocytaire T.

Plus particulièrement, l'invention s'étend aux applications des composés selon l'invention à titre thérapeutique pour le traitement curatif ou préventif des pathologies produisant des cellules sensibles aux lymphocytes T γ 9 δ 2 des primates dans un milieu pouvant contenir ces lymphocytes T γ 9 δ 2 et dans lequel ces cellules peuvent être mises au contact des lymphocytes T γ 9 δ 2.

Avantageusement et selon l'invention, on utilise au moins un composé selon l'invention à une concentration dans le milieu qui procure une activation de la prolifération polyclonale des lymphocytes T γ 9 δ 2. Ce milieu peut être choisi parmi le sang humain, le sang d'un primate non humain, les extraits de sang humain, et les extraits de sang d'un primate non humain.

Ledit milieu peut être extracorporel, ledit procédé d'activation selon l'invention étant alors un traitement cellulaire extracorporel, pouvant notamment servir en laboratoire, par exemple pour l'étude des lymphocytes T γ 9 δ 2 ou de leurs propriétés.

Ledit milieu peut être aussi intracorporel, l'activation des lymphocytes T γ 9 δ 2 ayant alors une utilité thérapeutique.

Plus particulièrement, ledit milieu est le sang périphérique d'un primate. L'invention s'étend donc en particulier à un procédé d'activation des lymphocytes T γ 9 δ 2 du sang périphérique d'un primate -notamment de l'homme- dans lequel on administre une quantité apte à activer les lymphocytes T γ 9 δ 2 d'au moins un composé selon l'invention. On administre donc au moins un composé

selon l'invention par voie générale -notamment parentérale dans le sang périphérique-.

Ledit milieu peut aussi être un site cellulaire à traiter, et on administre au moins un composé selon l'invention directement au contact du site cellulaire à traiter (administration topique).

L'invention s'étend ainsi en particulier aux applications thérapeutiques des composés selon l'invention pour le traitement des pathologies des primates appartenant au groupe formé des cancers, des maladies infectieuses, notamment mycobactériennes (lèpre, tuberculose...) ; des parasitoses (paludisme...) ; des pathologies à syndrome d'immunodéficience (SIDA, ...). Selon l'invention, on administre une composition thérapeutique adaptée pour libérer dans le sang périphérique et/ou sur un site cellulaire à traiter une quantité d'au moins un composé selon l'invention apte à activer les lymphocytes T γ 9 δ 2. En effet, il a été démontré de façon générale dans l'art antérieur sus-cité qu'une composition ayant la propriété d'activer les lymphocytes T γ 9 δ 2 peut être avantageusement utilisée pour le traitement de ces pathologies.

De façon traditionnelle, dans tout le texte, les termes "thérapie" ou "thérapeutique" englobent non seulement les traitements curatifs ou les soins, mais également les traitements préventifs (prophylaxie) tels que la vaccination. En effet, en permettant l'activation des lymphocytes T γ 9 δ 2, l'invention permet des traitements d'immunostimulation pouvant être avantageux aussi bien à titre prophylactique en empêchant le développement de cellules pathogènes sensibles aux lymphocytes T γ 9 δ 2, qu'à titre curatif en induisant la destruction de cellules pathogènes sensibles aux lymphocytes T γ 9 δ 2.

L'invention s'étend ainsi à une composition thérapeutique comprenant au moins un composé selon l'invention. Plus particulièrement, l'invention concerne une composition thérapeutique comprenant une quantité apte à être administrée à un primate -notamment au contact du sang périphérique ou par voie topique d'au moins un composé selon l'invention -notamment pour le traitement préventif ou curatif des pathologies sus-citées-. Une composition selon l'invention peut être une composition immunostimulante, ou un vaccin, les composés selon l'invention étant des antigènes activant les lymphocytes T γ 9 δ 2.

Une composition thérapeutique selon l'invention peut être préparée sous une forme galénique apte à être administrée par voie générale, notamment par voie parentérale directement dans le sang périphérique d'un primate, avec au moins un composé selon l'invention en quantité adaptée pour activer les lymphocytes Ty982 et un ou plusieurs excipient(s) approprié(s). Compte tenu de la très faible valeur de la concentration active des composés selon l'invention (de l'ordre de 1 à 100 nM), une telle administration est envisageable sans risque de toxicité.

Une composition thérapeutique selon l'invention peut aussi être préparée sous une forme galénique appropriée pour son administration topique, directement au contact des cellules sensibles aux lymphocytes Ty982.

La forme galénique d'une composition thérapeutique selon l'invention est réalisée selon la voie d'administration choisie, par les techniques traditionnelles de formulation galénique. La quantité et la concentration de composé(s) selon l'invention, et la posologie sont déterminées par référence aux traitements chimiothérapeutiques connus des maladies à traiter, compte tenu de la bioactivité des composés selon l'invention vis-à-vis des lymphocytes Ty982, de l'individu à traiter, de la maladie concernée et des effets biologiques recherchés.

Avantageusement et selon l'invention, pour un composé bioactif à une concentration comprise entre 10nM et 100nM, on administre par voie générale une quantité de composé(s) selon l'invention comprise entre 1µg et 1000µg --notamment entre 10µg et 100µg- par kilogramme de poids du patient.

Par ailleurs, il a été démontré in vitro que les composés selon l'invention ne présentent aucune toxicité générale, même pour des concentrations pouvant aller jusqu'à 100µM, soit de l'ordre de 10^4 fois la concentration bioactive. En outre, on sait que la catégorie biochimique de molécules à laquelle les composés selon l'invention appartiennent (phosphoesters) constitue une famille de composés métabolites rencontrés dans toute cellule vivante. Les composés selon l'invention ne présentent donc pas d'autres effets toxiques que ceux induits par leur bioactivité sur les lymphocytes Ty982.

En outre, certains composés selon l'invention présentent un poids moléculaire suffisamment faible (notamment inférieur à 500) pour être compatible avec leur élimination par voie rénale et urinaire.

Un exemple de formulation de composition thérapeutique injectable selon l'invention pour un primate de 1kg est le suivant : 50µg de 3,4-époxy-3-méthyl-1-butyl diphosphate (Epoxy-PP) dilués dans 0,5ml de tampon phosphate stérile à pH 7 amenés à 37°C.

On administre ainsi 50µg d'Epoxy-PP (composé de formule (2)) pour 1kg d'animal, correspondant à une concentration dans le sang circulant adaptée pour être supérieure à la concentration bioactive de l'Epoxy-PP (une concentration de 100nM d'Epoxy-PP correspondant à environ 50ng/ml).

Il est à noter que les excipients ou autres additifs pharmaceutiquement acceptables traditionnellement utilisés, sont chimiquement compatibles avec les composés selon l'invention.

Une composition thérapeutique selon l'invention peut aussi avantageusement comprendre un ou plusieurs autre(s) principe(s) actif(s), notamment pour procurer un effet synergique. En particulier, un composé selon l'invention peut faire office d'adjuvant de vaccin. La composition thérapeutique vaccinnante selon l'invention est alors formée d'une composition vaccinnante connue à laquelle on rajoute une quantité de composé(s) selon l'invention apte à activer les lymphocytes Ty9δ2 qui non seulement pourront exercer directement leur activité anti-infectieuse, mais aussi activer les lymphocytes T effecteurs de la réponse vaccinnale traditionnelle.

Une composition thérapeutique selon l'invention peut aussi incorporer elle-même des lymphocytes Ty9δ2 de primates en culture dans un milieu compatible avec la croissance lymphocytaire T. Elle peut alors servir au traitement des primates, ou plus généralement des animaux vertébrés avec lesquels l'administration des lymphocytes Ty9δ2 de primates peut être effectuée dans des conditions de compatibilité immunitaire vis-à-vis desdits lymphocytes Ty9δ2 de primates. Une telle composition selon l'invention peut être administrée par voie générale, ou même par voie topique, au contact des cellules cibles pathogènes, sensibles auxdits lymphocytes Ty9δ2 de primates.

L'invention s'étend aussi à l'utilisation d'au moins un composé selon l'invention pour la fabrication d'une composition thérapeutique selon l'invention, Plus particulièrement, l'invention porte sur l'utilisation d'au moins un composé selon l'invention pour la fabrication d'une composition thérapeutique destinée au traitement préventif ou curatif d'une pathologie de l'homme ou de l'animal vertébré produisant des cellules sensibles aux lymphocytes Ty982 des primates -notamment une pathologie sélectionnée dans le groupe formé des cancers, des maladies infectieuses, des parasitoses et des pathologies à syndrome d'immunodéficience-. A ce titre, l'invention s'étend aussi à l'utilisation d'au moins un composé selon l'invention pour la fabrication d'une composition thérapeutique destinée à être administrée -notamment au contact du sang périphérique ou par voie topique- à un primate -notamment à l'homme- pour le traitement préventif ou curatif d'une pathologie telle que mentionnée ci-dessus.

L'invention s'étend aussi à un procédé de fabrication d'une composition -notamment une composition thérapeutique- selon l'invention ayant la propriété d'activer les lymphocytes Ty982, dans lequel on utilise au moins un composé selon l'invention.

L'invention porte aussi sur un procédé de fabrication d'une composition thérapeutique destinée au traitement préventif ou curatif d'une pathologie de l'homme ou de l'animal vertébré produisant des cellules pathogènes sensibles aux lymphocytes Ty982 de primates, dans lequel on utilise au moins un composé selon l'invention. L'invention porte en particulier sur un procédé de fabrication d'une composition thérapeutique destinée à être administrée -notamment au contact du sang périphérique ou par voie topique- à un primate pour le traitement préventif ou curatif d'une pathologie produisant des cellules sensibles aux lymphocytes Ty982 -notamment une pathologie appartenant au groupe mentionné ci-dessus-, dans lequel on utilise au moins un composé selon l'invention.

Avantageusement et selon l'invention, dans un procédé de fabrication selon l'invention, on met au moins un composé selon l'invention au contact d'un milieu contenant des lymphocytes Ty982 de primates, et compatible avec la croissance lymphocytaire T, en une quantité adaptée pour activer ces

lymphocytes T γ 9 δ 2 dans ce milieu. Avantageusement et selon l'invention, ledit milieu comprend une substance choisie parmi le sang des primates et les extraits de sang des primates.

Il est à noter que les composés selon l'invention sont
 5 époxydiques et ne correspondent pas aux phosphoantigènes naturels, notamment aux molécules dites Tubag1, Tubag2, Tubag3 et Tubag4 obtenues comme décrit par WO 95/20673. En effet, on démontre par exemple que ces phosphoantigènes naturels sont dégradés par l'eau de brome ou par traitement au borohydrure de sodium en milieu aqueux basique, alors que les composés selon l'invention ne
 10 sont pas sensibles à ces réactifs. Les composés selon l'invention ne sont donc pas des antigènes naturels, mais sont des antigènes synthétiques activateurs des lymphocytes T γ 9 δ 2 à des concentrations du même ordre, et avec une efficacité semblable voire même supérieure à celle des antigènes naturels.

Il est aussi à noter que, contrairement à l'état de la
 15 technique tel qu'illustré par US-5639653 qui considérait que la présence d'un groupe alkyle ou alcène était indispensable pour activer les lymphocytes T γ 9 δ 2 humains, les inventeurs ont constaté qu'en détruisant la liaison alcène en lui substituant un groupe époxyde, une activation des lymphocytes T γ 9 δ 2 extrêmement forte et à très faible concentration est obtenue. En particulier, on
 20 constate que l'effet peut même dépasser celui des phosphoantigènes d'origine naturelle.

D'autres caractéristiques, buts et avantages de l'invention apparaissent à la lecture des exemples qui suivent donnés à titre non limitatifs uniquement à des fins de compréhension, ainsi que des figures dans lesquelles :

- 25 - la figure 1 est un graphe représentant des résultats obtenus dans l'exemple 5,
 - la figure 2 est un graphe représentant des résultats obtenus dans l'exemple 6.

EXEMPLE 1 : Fabrication du 3,4 époxy-3-méthyl-1-butyl-
 30 pyrophosphate (Epoxy-PP)

Préparation du 3-méthyl-3-butène-1-yl -tosylate (Isopentenyl tosylate) :

Dans un réacteur en verre équipé pour la manipulation sous atmosphère inerte et soigneusement séché, sont introduits sous agitation magnétique (2,32 mmoles - 442mg) de chlorure de tosyle et (2,55 mmoles - 312 mg) de 4-(N,N-diméthylamino)pyridine dans 5 ml de dichlorométhane anhydre.

- 5 A ce mélange, on ajoute lentement à l'aide d'une seringue et par l'intermédiaire d'un septum (2,32 mmoles - 200 mg) d'isopenténol en solution dans environ 1ml de dichlorométhane. La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince de silice (gel de silice 60 F-254 - éluant : pentane/acétate d'éthyle 85/15 v/v - R_f (produit) = 0,4 et R_f (TsCl) = 0,5). Après environ 3 heures d'agitation
- 10 sous atmosphère d'azote on dilue le mélange réactionnel dans un grand volume d'hexane (environ 100ml) ce qui entraîne la formation immédiate d'un précipité blanc. Le mélange est ensuite filtré et le filtrat concentré par évaporation sous pression réduite. La solution est diluée avec du diéthyl éther et filtrée à nouveau. Après évaporation du solvant, on obtient une huile jaunâtre. Le produit est purifié
- 15 par chromatographie sur colonne préparatrice de silice (gel de silice 60 - éluant : pentane/acétate d'éthyle 85/15). (1,98 mmoles - 475 mg) de 3-méthyl-3-butène-1-yl -tosylate (85 % en rendement isolé) sont ainsi obtenus. Le composé (huile incolore) est stocké à + 4°C en milieu anhydre.

Préparation du tris(tetra-n-butylammonium) hydrogènapyrophosphate :

- 20 (4,5 mmoles - 1g) de sel de disodium dihydrogènapyrophosphate ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$) sont dissous dans 10 ml d'eau déionisée froide préalablement ajustée à pH 9 par une solution d'ammoniaque 10mM. La solution est passée sur une colonne contenant (19 milliéquivalents - 4 g) de résine cationique DOWEX® 50-WX8 -200 (forme H^+). La solution acide est éluée
- 25 avec 15-20 ml d'eau déionisée froide à pH 9. La solution collectée est immédiatement titrée à pH 7,3 par une solution aqueuse d'hydroxyde de tétra-n-butylammonium (Bu_4NOH) à 40%. Après lyophilisation on obtient 4 g de sel de tétra-n-butylammonium sous la forme d'un solide blanc hygroscopique. Le sel est dissout dans 10 ml d'acétonitrile anhydre. La solution est ensuite filtrée puis
- 30 séchée par évaporations successives du solvant sous pression réduite. On obtient ainsi une solution de tris(tetra-n-butylammonium) hydrogènapyrophosphate avec une pureté égale à 98 % (résultat déduit de l'analyse par chromatographie

ionique - HPAEC). Le volume est ajusté afin d'obtenir une concentration en sel comprise entre 0,5 et 1M. La solution est stockée à -20 °C en milieu anhydre.

Préparation du 3-méthyl-3-butène-1-yl -diphosphate (Isopentenyl Pyrophosphate) :

5 Dans un réacteur en verre soigneusement séché, on introduit sous atmosphère d'azote 2,5 ml d'une solution de tris(tétra-n-butylammonium) hydrogènapyrophosphate à 0,7 M (1,75 mmoles) dans l'acétonitrile anhydre. Le réacteur est refroidi par un bain de glace puis on ajoute sous agitation magnétique et à l'aide d'une seringue (0,70 mmoles - 168 mg) de
10 3-méthyl-3-butène-1-yl -tosylate en solution dans un minimum d'acétonitrile (0,5 - 1M). Après introduction du tosylate, le bain de glace est retiré puis la réaction est laissée sous agitation à température ambiante. L'avancement de la réaction est alors suivi par chromatographie ionique (HPAEC). Après environ 3 heures, le solvant est évaporé sous pression réduite et le milieu réactionnel redissout dans 3
15 ml d'un mélange eau /2-propanol 98/2 (v/v). La solution est passée sur une colonne contenant (19 milliéquivalents - 4 g) de résine cationique DOWEX® 50-WX8 -200 (forme NH_4^+) puis éluée avec 10 ml du mélange eau (pH 9)/2-propanol 98/2 (v/v). Après lyophilisation, on recueille un solide blanc contenant le produit brut.

20 Purification :

Le pyrophosphate et les traces de monophosphate d'ammonium sont séparés du milieu par co-précipitation en présence d'hydrogénocarbonate d'ammonium. On dissout le produit brut obtenu à l'étape précédente dans 4 ml d'hydrogénocarbonate d'ammonium 0,1 M que l'on
25 transfère dans un tube à centrifugation de 25 ml. On traite alors la solution avec 10 ml d'un mélange acétonitrile/2-propanol 1/1 (v/v) en agitant vigoureusement le mélange (vortex) pendant quelques minutes jusqu'à formation d'un précipité blanc. Le tube est ensuite centrifugé à 2000 tr/min à 10 °C pendant 5min. Le surnageant, dans lequel sont extraits les sels organiques, est conservé à +4°C. La
30 procédure est renouvelée en redissolvant le précipité dans 3ml d'hydrogénocarbonate d'ammonium 0,1 M auxquels on ajoute 7 ml du mélange

acétonitrile/2-propanol. Les deux surnageants sont regroupés et le solvant évaporé sous vide. On obtient un liquide huileux que l'on conserve à +4°C.

Le tosylate d'ammonium est séparé du milieu réactionnel par extraction avec le solvant chloroforme/méthanol 1/1 (v/v). Le liquide huileux de l'étape précédente est dissout dans 4 ml d'eau à pH 9 et traité avec 1ml de ce solvant par une procédure classique d'extraction répétée 3 fois. On élimine ensuite de la phase aqueuse les traces de solvant par évaporation sous pression réduite à 30 °C. On obtient sur la base de l'analyse par chromatographie ionique (HPAEC) un rendement de 83 % en 3-méthyl-3-butène-1-yl -diphosphate (0,58 mmol - 172 mg). La solution est stockée à -20 °C.

Le produit est purifié ultérieurement selon les besoins par chromatographie d'échange d'anions sur cartouches Sep-Pak® Accell® Plus QMA (Waters®) de 360 mg à 10g de phase adsorbante éluées successivement par des solutions aqueuses d'hydrogénocarbonate d'ammonium respectivement de 10 mM, 50 mM puis 200 mM avec suivi chromatographique (HPAEC) des fractions éluées. Les fractions éluées à 200mM sont lyophilisées.

Préparation du 3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl pyrophosphate :

(0,34 mmole - 100 mg) d'isopentényl pyrophosphate (sel d'ammonium) en solution dans 2 ml d'eau déionisée de pH neutre sont traitées sous une hotte aspirante et à température ambiante par 1,9 ml (0,34 mmol) de brome en solution aqueuse saturée (0,18 M). On observe une décoloration rapide de l'eau de brome. La solution est placée 30 minutes à température ambiante, puis 30 minutes à +4 °C en effectuant périodiquement une agitation vigoureuse. On obtient quantitativement une solution de 3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl pyrophosphate (0,33 mmol - 130 mg) qui est stockée à -20 °C.

Préparation du 3,4 époxy-3-méthyl-1-butyl-pyrophosphate :

1 ml de la solution de 3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl pyrophosphate (3,34 mg - 8,5 µmol) obtenue à l'étape précédente est traité à température ambiante avec 1 ml d'une solution titrée de soude Baker® à 100 mM. La solution est agitée vigoureusement (vortex) pendant quelques minutes puis placée dans un bain de glace. La solution froide est ensuite passée sur une colonne contenant 2 à 3 g de résine cationique DOWEX® 50-WX8 -200 (forme

H⁺). La solution acide est éluée avec 5-10 ml d'eau déionisée froide à pH 9 et collectée dans un ballon contenant au moins 35 μ moles (0,35 ml) d'une solution d'ammoniaque à 100mM. Après lyophilisation de la solution (de pH neutre à légèrement basique) on récupère (2,7 mg - 8,5 μ moles) de 3,4 époxy-3-méthyl-1-butyl-pyrophosphate (sel d'ammonium) que l'on dissout dans de l'eau déionisée stérile. La solution est stockée à -20 °C.

EXEMPLE 2 : Fabrication du 3,4 époxy-3-méthyl-1-butyl-triphosphate (Epoxy-PPP) :

Préparation du tétrakis(tétra-n-butylammonium) hydrogènotriphosphate :

(2,1 mmoles - 1g) de sel de pentasodium tripolyphosphate hexahydrate ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) sont dissous dans 10 ml d'eau déionisée froide préalablement ajustée à pH 9 par une solution d'ammoniaque 10mM. La solution est passée sur une colonne contenant (21 milliéquivalents - 4,4 g) de résine cationique DOWEX® 50-WX8 (forme H⁺). La solution acide est éluée avec 20-25 ml d'eau déionisée froide à pH 9. La solution collectée est immédiatement titrée à pH 7,0 par une solution aqueuse d'hydroxyde de tétra-n-butylammonium (Bu_4NOH) à 40%. Après lyophilisation on obtient 2,5g de sel de tétra-n-butylammonium sous la forme d'un solide blanc hygroscopique. Le sel est dissout dans 10 ml d'acétonitrile anhydre. La solution est ensuite filtrée puis séchée par évaporations successives du solvant sous pression réduite. On obtient ainsi une solution de tétrakis(tétra-n-butylammonium) hydrogènotriphosphate avec une pureté égale à 95 % (résultat déduit de l'analyse par chromatographie ionique - HPAEC). Le volume est ajusté afin d'obtenir une concentration en sel comprise entre 0,5 et 1M. La solution est stockée à -20 °C en milieu anhydre.

Préparation du 3-méthyl-3-butène-1-yl-triphosphate (isopentenyl Triphosphate):

En suivant la procédure décrite pour la préparation du 3-méthyl-3-butène-1-yl -diphosphate (exemple 1), on fait réagir sous atmosphère d'azote 2 mmoles d'une solution molaire de tétrakis(tétra-n-butylammonium) hydrogènotriphosphate avec (1 mmole - 240mg) de 3-méthyl-3-butène-1-yl-tosylate préparé selon l'exemple 1 dans 4 ml d'acétonitrile anhydre pendant 24 heures. En utilisant une procédure de purification par précipitation-extraction analogue à celle appliquée au 3-méthyl-3-butène-1-yl-diphosphate, on obtient sur

la base de l'analyse par chromatographie ionique (HPAEC) un rendement de 74 % en 3-méthyl-3-butène-1-yl-triphosphate (0,74mmole - 292mg). Pour la préparation de phosphoépoxides selon l'invention, dans le cadre de tests biologiques, on utilise une fraction du produit obtenu à ce stade que l'on purifie par HPAEC sur colonne IonPac® AS11 en cumulant plusieurs passages chromatographiques. On prépare de cette manière environ 2 ml d'une solution aqueuse millimolaire de pH neutre de 3-méthyl-3-butène-1-yl-triphosphate sous forme de sel d'ammonium.

Préparation du 3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl-triphosphate :

500 nmoles (500 μ l d'une solution millimolaire) d'isopentényl triphosphate sont traitées à température ambiante par ajout de 500 nmoles de brome en solution aqueuse saturée (2,8 μ l d'eau de brome à 180 mM). On observe une décoloration quasi instantanée de l'eau de brome. Après 15 minutes avec agitation périodique à température ambiante, le 3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl-triphosphate est généré quantitativement (500 μ M d'une solution millimolaire).

Préparation du 3,4 époxy-3-méthyl-1-butyl-triphosphate :

La solution obtenue à l'étape précédente contenant 500 nmoles de 3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl-triphosphate est injectée en plusieurs fractions dans un système d'HPAEC Dionex® selon "High pH anion exchange chromatographic analysis of phosphorylated compounds : application to isolation and characterization of non peptide mycobacterial antigens", Y. Poquet *et al*, Anal. Biochem, 243 n° 1, 1996, p. 119-126. L'époxyde est formé quantitativement à chaque passage chromatographique et collecté en présence d'hydroxyde ou d'hydrogénocarbonate d'ammonium. Les fractions collectées sont lyophilisées. On prépare de cette manière environ 1 ml d'une solution aqueuse à 500 μ M de 3,4 époxy-3-méthyl-1-butyl-triphosphate que l'on stocke à - 20 °C.

EXEMPLE 3 : Fabrication du α,γ di-(3,4 époxy-3-méthyl-1-butyl)-triphosphate (di EpoxTP) :

Préparation du α,γ di-(3-méthyl-3-butène-1-yl)-triphosphate :

En suivant la procédure décrite pour la préparation du 3-méthyl-3-butène-1-yl -diphosphate (exemple 1), on fait réagir sous atmosphère

d'azote 0,5 mmoles d'une solution molaire de tetrakis(tetra-n-butylammonium) hydrogènotriphosphate (préparé selon l'exemple 2) avec (1 mmole - 240 mg) de 3-méthyl-3-butène-1-yl-tosylate (préparé selon l'exemple 1) dans 4ml d'acétonitrile anhydre pendant 24 heures. En utilisant une procédure de purification par précipitation-extraction analogue à celle appliquée au 3-méthyl-3-butène-1-yl-diphosphate, on obtient sur la base de l'analyse par chromatographie ionique (HPAEC) un rendement de 81 % en α,γ di-(3-méthyl-3-butène-1-yl)-triphosphate (0,4 mmoles - 178 mg). Pour la préparation de phosphohalohydrines dans le cadre de tests biologiques, on utilise une fraction du produit obtenu à ce stade que l'on purifie par HPAEC sur colonne IonPac® AS11 en cumulant plusieurs passages chromatographiques. Avant chaque passage chromatographique et pour une meilleure isolation du produit, on effectue un traitement enzymatique à la phosphatase alcaline de la fraction à purifier pour dégrader l'isopentényl triphosphate, qui est un sous produit de la réaction. On prépare de cette manière environ 1 ml d'une solution aqueuse millimolaire de pH neutre de α,γ di-(3-méthyl-3-butène-1-yl)-triphosphate sous forme de sel d'ammonium.

Préparation du α,γ di-[3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl]-triphosphate :

250 nmoles (250 μ l d'une solution millimolaire) de α,γ di-(3-méthyl-3-butène-1-yl)-triphosphate sont traitées à température ambiante par ajout de 250 nmoles de brome en solution aqueuse saturée (1,4 μ l d'eau de brome à 180 mM). On observe une décoloration quasi instantanée de l'eau de brome. Après 15 minutes avec agitation périodique à température ambiante, le produit α,γ di-[3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl]-triphosphate est généré quantitativement (250 μ l d'une solution millimolaire).

Préparation du α,γ di-(3,4 époxy-3-méthyl-1-butyl)-triphosphate :

La solution obtenue à l'étape précédente contenant 250 nmoles de α,γ di-[3-(bromométhyl)-3-butanol-1-yl]-triphosphate est injectée en plusieurs fractions dans un système d'HPAEC Dionex® DX500 comme décrit dans l'exemple 2. On prépare de cette manière environ 0,5 ml d'une solution aqueuse à 500 μ M de α,γ di-[3,4 époxy-3-méthyl-1-butyl]-triphosphate que l'on stocke à - 20 °C.

EXEMPLE 4 : Fabrication de l'uridine 5'-triphosphate γ -(3,4 époxy-3-méthyl-1-butyl) (Epoxy-UTP) :

Préparation de l'uridine 5'-triphosphate γ -(3-méthyl-3-butène-1-yl) :

Ce produit est préparé selon la procédure décrite par
 5 KNORRE D. C. et al. "General Method for the synthesis of ATP Gamma-derivatives" Febs Letters, 1976, 70-1, 105-108, à partir de 40 μ moles d'uridine-5'-triphosphate (UTP) (sel de triéthylammonium) en présence d'un excès d'isopenténol. Pour la préparation de phosphépoxydes selon l'invention, dans le cadre de tests biologiques, une fraction du produit obtenu est purifié par HPAEC
 10 sur colonne IonPac® AS11 en cumulant plusieurs passages chromatographiques. Avant chaque étape chromatographique et pour une meilleure isolation du produit, on effectue un traitement enzymatique à la phosphatase alcaline de la fraction à purifier pour dégrader les sous produits (UDP et UMP) et l'UTP n'ayant pas réagi. On prépare de cette manière environ 500 μ l d'une solution
 15 aqueuse à 300 μ M de pH neutre de l'uridine 5'-triphosphate γ -(3-méthyl-3-butène-1-yl) sous forme de sel d'ammonium.

Préparation de l'uridine 5'-triphosphate γ -[3-(iodométhyl)-3-butanol-1-yl] :

75 nmoles (250 μ l d'une solution 300 μ M) de l'uridine 5'-triphosphate γ -3-méthyl-3-butène-1-yl sous forme de sel d'ammonium sont
 20 traitées en milieu aqueux de pH neutre par ajout de 108 μ l d'eau iodée à 0,7 mM préparée selon l'exemple 2. La solution est laissée 20 minutes à température ambiante en effectuant périodiquement une agitation vigoureuse. Après décoloration de l'eau iodée, le produit l'uridine 5'-triphosphate γ -[3-(iodométhyl)-3-butanol-1-yl] est généré quantitativement (environ 360 μ l d'une solution à 200
 25 μ M).

Préparation de l'uridine 5'-triphosphate γ -(3,4 époxy-3-méthyl-1-butyl) :

La solution obtenue à l'étape précédente contenant 75 nmoles de l'uridine 5'-triphosphate γ -[3-(iodométhyl)-3-butanol-1-yl] est injectée en plusieurs fractions dans un système d'HPAEC Dionex® DX500 comme décrit
 30 dans l'exemple 2. On prépare de cette manière environ 0,5 ml d'une solution aqueuse à 150 μ M de l'uridine 5'-triphosphate γ -(3,4 époxy-3-méthyl-1-butyl) que l'on stocke à - 20 °C.

EXEMPLE 5 : Mesure de l'activité antigénique par stimulation de la prolifération des lymphocytes Ty982 en culture.

Dans une culture in vitro de 10^6 lymphocytes T totaux dans 1ml, séparés à partir du sang d'un donneur humain sain adulte et contenant
5 initialement de 1-5% de lymphocytes Ty982 en milieu de culture adéquat (RPMI 1640+10% de sérum humain inactivé et 50 U/ml d'interleukine 2 humaine (hIL-2), on rajoute 20 microlitres de solution aqueuse du composé selon l'invention à tester amené à la concentration finale spécifiée dans l'essai. Après 4 jours de culture, on rajoute par millilitre de milieu de culture 50 U d'hIL-2. Après huit
10 jours les cellules sont énumérées, collectées, lavées par un tampon phosphate, et les cellules de type Ty982 sont révélées dans la culture par un marquage avec les réactifs commerciaux usuels (Anticorps monoclonaux fluorescéinés) et leur proportion déterminée par une analyse de cytométrie en flux. On prend en compte soit le changement de la proportion, soit l'augmentation numérique des
15 cellules Ty982 dans des cultures en présence du composé selon l'invention par rapport à des cultures exemptes de composé selon l'invention. On représente le résultat de ces essais en traçant les courbes de ces valeurs (ordonnées figure 1) en fonction de la concentration en échelle logarithmique de composé selon l'invention mis en culture (abscisses figure 1).

20 La figure 1 représente les résultats obtenus avec le composé selon l'invention obtenu à l'exemple 1 (Epoxy-PP), la ligne en pointillés représentant un contrôle négatif (valeur obtenue en l'absence de composé selon l'invention).

25 Le tableau suivant illustre les valeurs de DE50, dose efficace à 50 % de l'effet maximal d'amplification lymphocytaire polyclonale obtenu comme indiqué ci-dessus, avec l'IPP (à titre comparatif), et avec différents composés selon l'invention.

MOLECULE			DE 50% nM
Nom	Abréviation	Structure	
isopentenyl diphosphate	IPP	$\text{CH}_3 - \overset{\text{CH}_2}{\underset{\parallel}{\text{C}}} - (\text{CH}_2)_2 - \text{OPP}$	3000
3,4-époxy-3- méthyl-1-butyl- diphosphate	Epox-PP	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{O} \\ \backslash \quad / \\ \text{H}_3\text{C} - \text{C} - (\text{CH}_2)_2 - \text{OPP} \end{array}$	20
3,4-époxy-3- méthyl-1-butyl- triphosphate	Epox-PPP	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{O} \\ \backslash \quad / \\ \text{H}_3\text{C} - \text{C} - (\text{CH}_2)_2 - \text{OPPP} \end{array}$	100
α, γ di 3,4-époxy- 3-méthyl-1-butyl- triphosphate	di-EpoxTP	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{O} \qquad \qquad \qquad \text{CH}_2 - \text{O} \\ \backslash \quad / \qquad \qquad \qquad \backslash \quad / \\ \text{H}_3\text{C} - \text{C} - (\text{CH}_2)_2 - \text{OPPPO} - (\text{CH}_2)_2 - \text{C} - \text{CH}_3 \end{array}$	2000

EXEMPLE 6 : Mesure de l'activité antigénique par stimulation de la cytotoxicité induite :

5 On compare l'activité cytotoxique spécifique d'un clone de lymphocyte Ty982 mesurée selon le test de cytotoxicité induite, cette activité étant simulée avec des concentrations décroissantes du phosphoantigène Tubag3 obtenu comme décrit par WO 95/20673 (courbe représentée par des carrés noirs figure 2), du composé Epox-PP selon l'invention obtenu à l'exemple 1 (courbe représentée par des ronds noirs figure 2), et de l'isopentenyl pyrophosphate IPP (courbe représentée par des triangles noirs figure 2).

10 On constate que le composé selon l'invention de l'exemple 1 est actif à une concentration de l'ordre de 20 nM alors que l'IPP de l'art antérieur est actif à une concentration de l'ordre de 3 μM , soit 150 fois plus élevée.

EXEMPLE 7 : Démonstration de la différence de structure entre un composé selon l'invention époxydique et les phosphoantigènes naturels Tubag mycobactériens.

20 On compare la bioactivité du composé selon l'invention Epox-PP (obtenu comme indiqué à l'exemple 1) à celle d'un stock de phosphoantigènes naturels Tubag obtenus comme décrit par WO 95/20673.

La bioactivité est mesurée par un test de cytotoxicité induite comme décrit à l'exemple 6 par le composé à tester dilué de 1:30 à partir de solutions des composés de 5 à 10 μ M.

Avant de mesurer la bioactivité, les composés sont soumis à un traitement chimique transitoire par contact avec l'un des réactifs suivants :
 5 NaIO_4 (5mM) ; NaBH_3CN (10mM, pH 7) ; KMnO_4 (1mM) ; eau de brome Br_2 , H_2O (7mM), puis neutralisation du réactif.

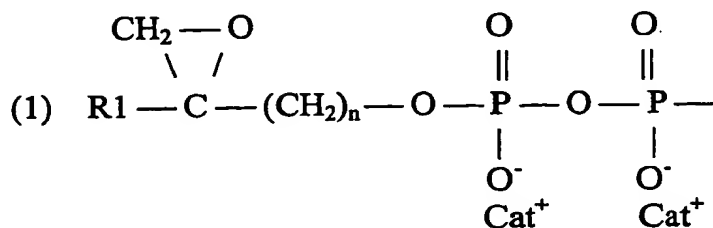
Le tableau suivant donne les résultats obtenus par plusieurs essais indépendants réalisés dans chaque cas. + indique la détection d'une activité
 10 sur les lymphocytes Ty982, - indique qu'aucune activité n'a pu être détectée.

REACTIF	Bioactivité après traitement chimique :				
	aucun	Na IO_4	$\text{Na BH}_3\text{CN}$	KMnO_4	$\text{Br}_2, \text{H}_2\text{O}$
		(5mM)	(10mM pH7)	(1mM)	(7mM)
Tubag	+	+	+	-	-
Epox-PP	+	+	+	+	+

On constate que le traitement des phosphoantigènes naturels mycobactériens Tubag par le KMnO_4 dilué ou par l'eau de brome abroge complètement leur bioactivité. Par contre les composés phosphoépoxides selon
 15 l'invention qui sont stimulants à des concentrations de l'ordre de 20 nM résistent à ces mêmes traitements chimiques, ce qui démontre la différence de structure chimique entre les composés synthétiques selon l'invention et les Tubag d'origine naturelle.

REVENDECATIONS

1/ - Composés comprenant au moins un groupement phosphoépoxyde de formule :



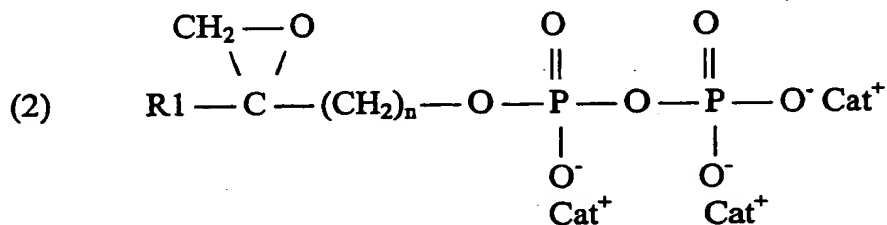
où R1 est choisi parmi $-\text{CH}_3$ et $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$,

Cat⁺ est un cation organique ou minéral,

n est un nombre entier compris entre 2 et 20,

pour leur utilisation à titre de substances thérapeutiquement actives.

2/ - Composés phosphoépoxydes de formule :



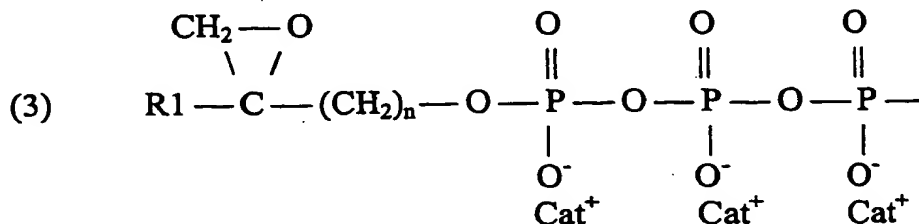
où R1 est choisi parmi —CH_3 et $\text{—CH}_2\text{—CH}_3$,

Cat⁺ est un cation organique ou minéral,

n est un nombre entier compris entre 2 et 20,

pour leur utilisation à titre de substances thérapeutiquement actives.

3/ - Nouveaux composés comprenant au moins un groupement phosphoépoxyde de formule :

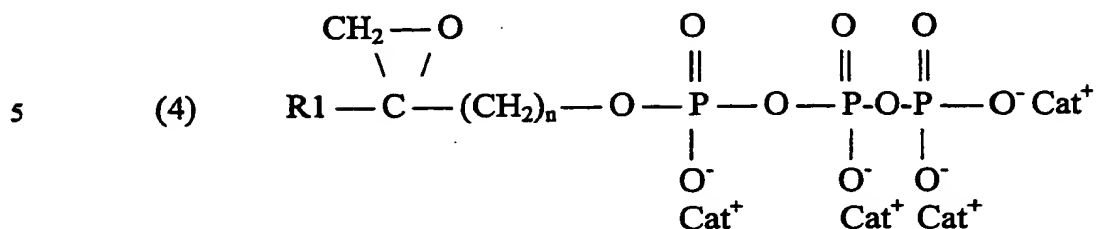


où R1 est choisi parmi —CH₃ et —CH₂—CH₃

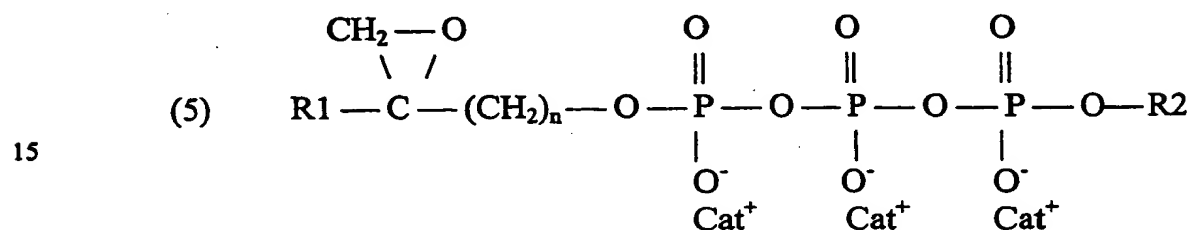
Cat⁺ est un cation organique ou minéral

n est un nombre entier compris entre 2 et 20.

4/ - Nouveaux composés phosphoépoxydes selon la revendication 3 de formule :

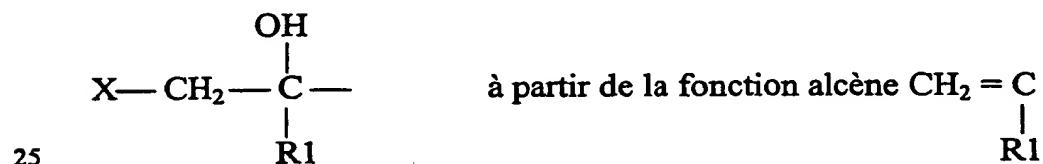


10 5/ - Nouveaux composés phosphoépoxydes selon la
revendication 3, de formule :



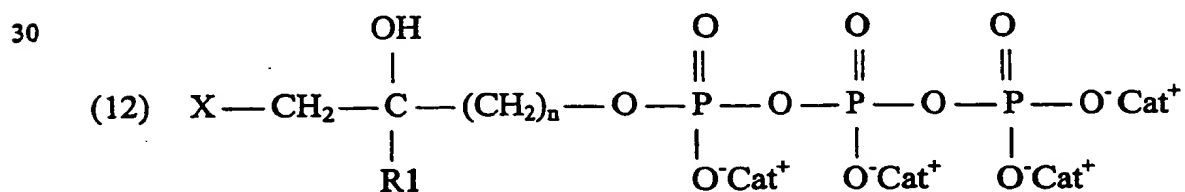
où R2 est un substituant organique ou minéral choisi dans le groupe formé :

20 - des substituants qui n'empêchent pas la formation de la fonction halohydrine

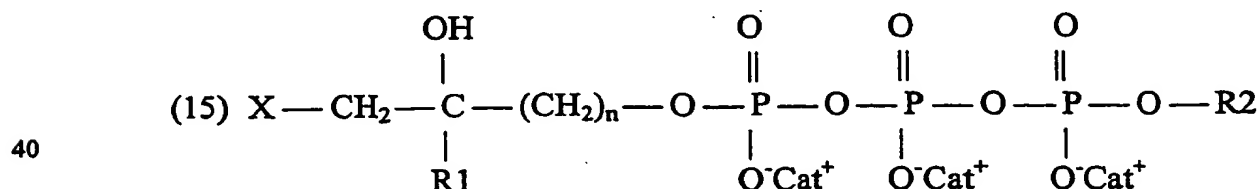


et de l'halogène X_2 en présence d'eau ;

- et des substituants pour lesquels il existe un composé R²-O-Y non réactif sur la fonction halohydrine du composé de formule :



35 et choisi pour que R2-O-Y puisse réagir sur le phosphate terminal de ce composé
(12) pour obtenir le composé (15) :



- et des substituants pour lesquels il existe un composé R²-O-PPP, où PPP symbolise le groupement triphosphate.

6/ - Composés selon l'une des revendications 1, 3 et 5, comprenant au moins un groupement choisi dans le groupe formé des dérivés des
5 nucléosides, des oligonucléotides, des acides nucléiques (ARN, ADN), des acides aminés, des peptides, des protéines, des monosaccharides, des oligosaccharides, des polysaccharides, des acides gras, des lipides simples, des lipides complexes, de l'acide folique, de l'acide tétrahydrofolique, des acides phosphoriques, de l'inositol, des vitamines, des co-enzymes, des flavonoïdes, des
10 aldéhydes, des halohydrines, et des époxydes.

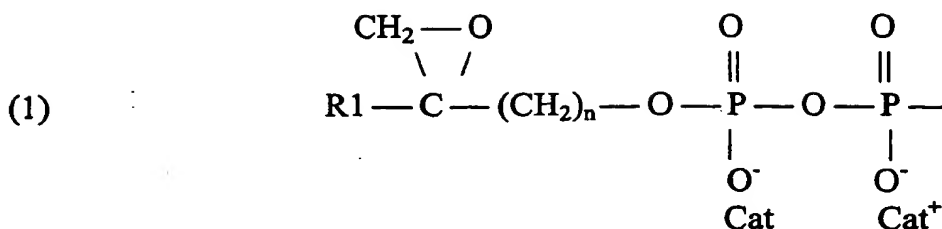
7/ - Composés selon les revendications 5 et 6, dans lesquels R² est en outre choisi dans le groupe formé des dérivés des nucléosides, des oligonucléotides, des acides nucléiques (ARN, ADN), des acides aminés, des peptides, des protéines, des monosaccharides, des oligosaccharides, des
15 polysaccharides, des acides gras, des lipides simples, des lipides complexes, de l'acide folique, de l'acide tétrahydrofolique, des acides phosphoriques, de l'inositol, des vitamines, des co-enzymes, des flavonoïdes, des aldéhydes, des halohydrines, des phosphoépoxydes selon la formule (1), et des époxydes.

8/ - Composés selon l'une des revendications 3 à 5 ou 7
20 pour leur utilisation comme substance thérapeutiquement actives.

9/ - Composés selon l'une des revendications 1 à 8 pour leur utilisation comme agents activateurs des lymphocytes T_H982.

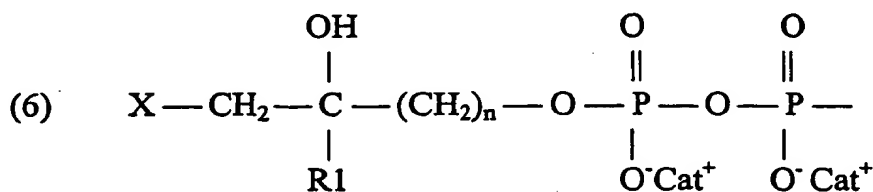
10/ - Composés selon l'une des revendications 1 à 9 pour leur utilisation à titre d'antigènes des lymphocytes T_H982 dans une composition
25 thérapeutique -notamment une composition immunostimulante ou un vaccin pour les primates.

11/ - Procédé de fabrication d'un composé comprenant au moins un groupement phosphoépoxyde de formule :



où R1 est choisi parmi $-\text{CH}_3$ et $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, Cat^+ est un cation organique ou minéral, n est un nombre entier compris entre 2 et 20, caractérisé en ce que :

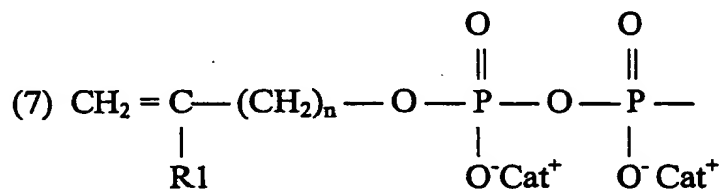
- on prépare tout d'abord un composé intermédiaire comprenant au moins un groupement phosphohalohydrine de formule :



où X est un halogène choisi parmi I, Br, Cl,

- on fait réagir le composé intermédiaire avec un milieu générateur d'hydroxydes pour transformer les fonctions halohydrines du composé intermédiaire en fonctions époxydes.

12/ - Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que pour préparer ledit composé intermédiaire, on fait réagir l'halogène X2 en présence d'eau avec un composé de départ comprenant au moins un groupement alcène phosphaté de formule :



13/ - Procédé selon l'une des revendications 11 et 12, caractérisé en ce qu'on fait réagir le composé intermédiaire en milieu aqueux basique pour transformer les fonctions halohydrines du composé intermédiaire en fonctions époxydes.

14/ - Procédé de fabrication d'une composition ayant la propriété d'activer les lymphocytes Ty982, dans lequel on utilise au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 7.

15/ - Procédé de fabrication d'une composition thérapeutique destinée au traitement préventif ou curatif d'une pathologie produisant des cellules sensibles aux lymphocytes Ty982, dans lequel on utilise au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 7.

5 16/ - Procédé de fabrication d'une composition thérapeutique destinée à être administrée à un primate pour le traitement préventif ou curatif d'une pathologie produisant des cellules sensibles aux lymphocytes Ty982, dans lequel on utilise au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 7.

10 17/ - Procédé de fabrication d'une composition thérapeutique destinée à être administrée à un primate pour le traitement préventif ou curatif d'une pathologie sélectionnée dans le groupe formé des cancers, des maladies infectieuses, des parasitoses, et des pathologies à syndrome d'immunodéficience, dans lequel on utilise au moins un composé selon l'une des
15 revendications 1 à 7.

18/ - Procédé selon l'une des revendications 14 à 17, dans lequel on met au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 11 au contact d'un milieu contenant des lymphocytes Ty982 compatible avec la croissance lymphocytaire T, en une quantité adaptée pour activer les
20 lymphocytes Ty982 dans ce milieu.

19/ - Procédé selon la revendication 18, dans lequel ledit milieu comprend une substance choisie parmi le sang des primates et les extraits de sang des primates.

20/ - Procédé d'activation extracorporelle de lymphocytes
25 Ty982, dans lequel on met les lymphocytes Ty982 au contact d'au moins un composé tel que défini à l'une des revendications 1 à 7 dans un milieu extracorporel contenant les lymphocytes Ty982 compatible avec la croissance lymphocytaire T.

21/ - Procédé selon la revendication 20, dans lequel on
30 utilise au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 7 à une concentration dans le milieu qui procure une activation de la prolifération polyclonale des lymphocytes Ty982.

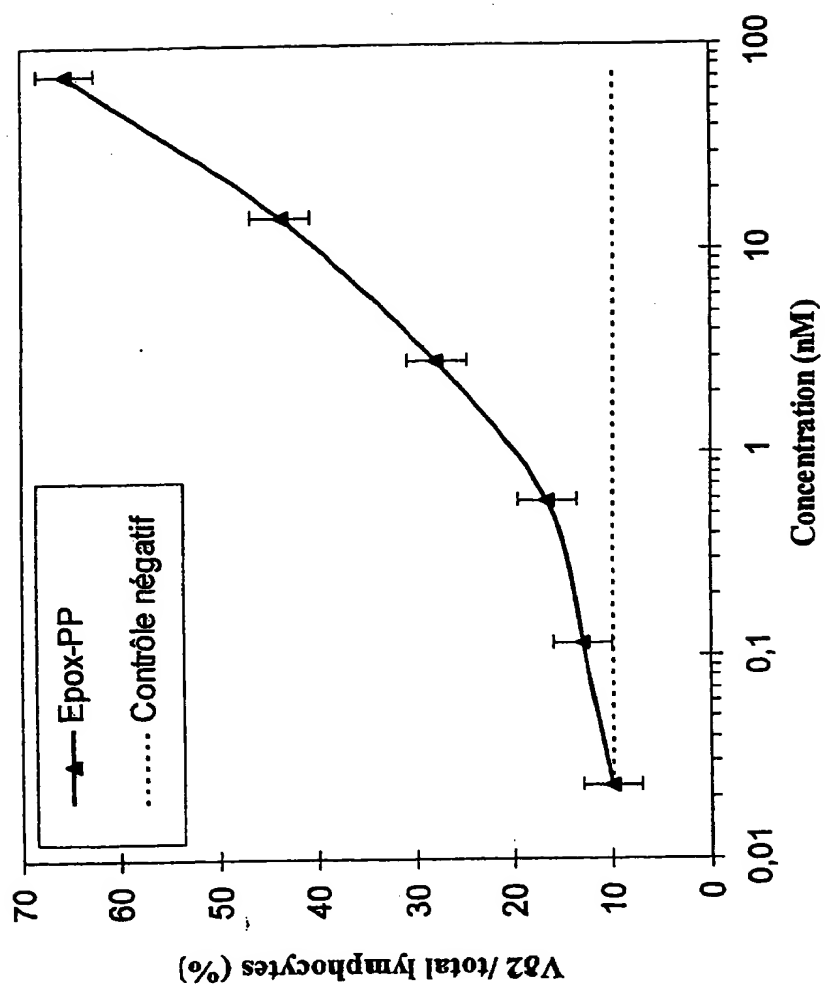


Fig. 1

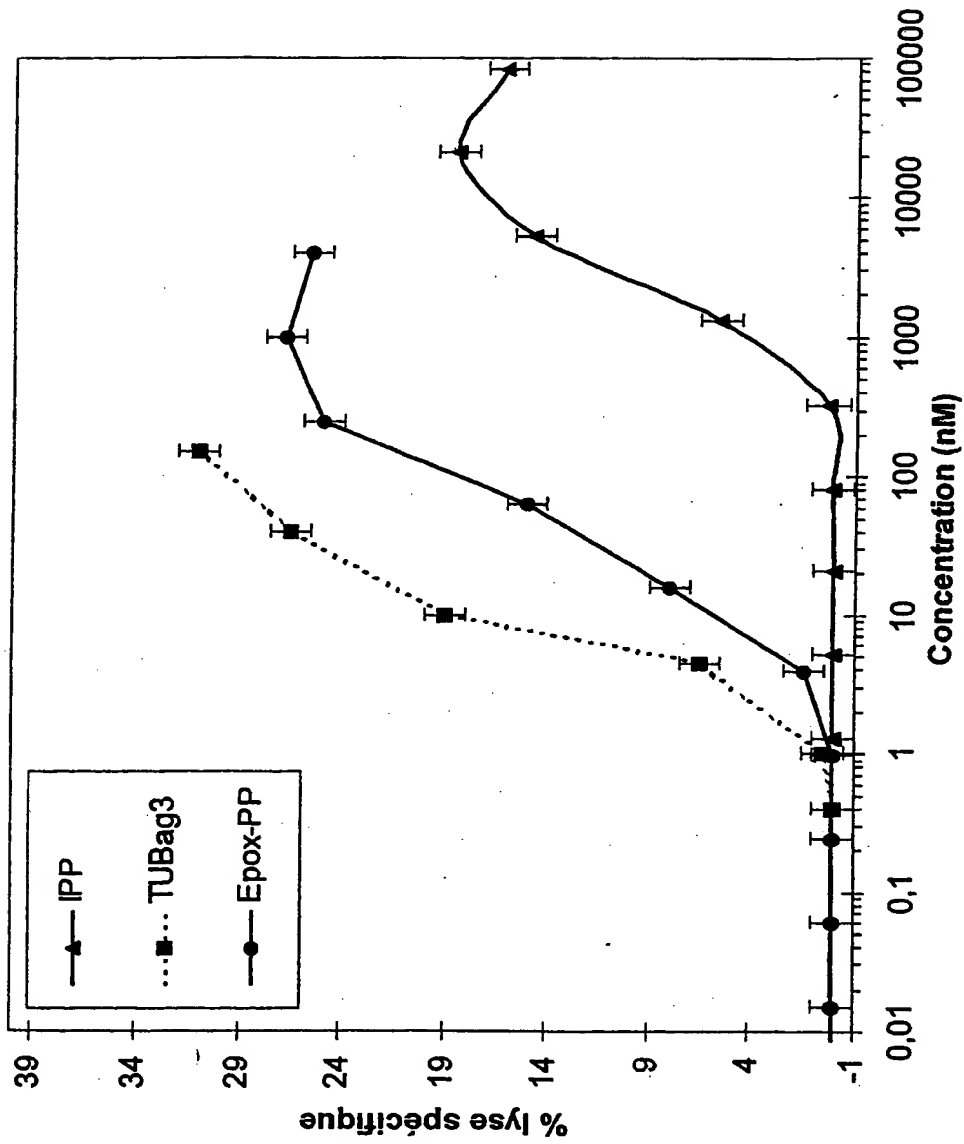


Fig. 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)